

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



17 FEB 2005

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. April 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/027069 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, 15/11, 15/63, A01K 67/027 (74) Anwalt: DÖRPER, Thomas; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008394 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 2003 (30.07.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 38 979.9 20. August 2002 (20.08.2002) DE  
102 47 599.7 11. Oktober 2002 (11.10.2002) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHOPFER, Christel, Renate [DE/DE]; Konvent 38, 06484 Quedlinburg (DE). SAUER, Matt [DE/DE]; Markt 9, 06484 Quedlinburg (DE). KLEBSATTEL, Martin [DE/DE]; Weingarten 9, 06484 Quedlinburg (DE). FLACHMANN, Ralf [DE/DE]; Halberstädter Str. 20a, 06484 Quedlinburg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TRANSGENIC EXPRESSION CASSETTES FOR THE EXPRESSION OF NUCLEIC ACIDS IN PLANT BLOOMS

(54) Bezeichnung: TRANSGENE EXPRESSIONSKASSETTEN ZUR EXPRESSION VON NUKLEINSÄUREN IN DER PFLANZLICHEN BLÜTE

(57) Abstract: The invention relates to methods for the targeted, transgenic expression of nucleic acid sequences in plant blooms and transgenic expression cassettes and expression vectors which have promoters with an expression specificity for plant blooms. The invention further relates to organisms modified with said transgenic expression cassettes or expression vectors (preferably plants), cultures derived therefrom, parts or propagation material and the use of the above for the production of human and animal feedstuffs, seed stock, pharmaceuticals or fine chemicals.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte, sowie transgene Expressionskassetten und Expressionsvektoren, die Promotoren mit einer Expressionsspezifität für die pflanzliche Blüte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen transgenen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren transformierte Organismen (bevorzugt Pflanzen), davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

WO 2004/027069 A1

## Transgene Expressionskassetten zur Expression von Nukleinsäuren in der pflanzlichen Blüte

### 5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte, sowie transgene Expressionskassetten und Expressionsvektoren, 10 die Promotoren mit einer Expressionsspezifität für die pflanzliche Blüte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen transgenen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren transformierte Organismen (bevorzugt Pflanzen), davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung der- 15 selben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel 20 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika (Dunwell JM (2000) J Exp Bot 51 Spec No:487-96). Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene ist die Bereitstellung von in Pflanzen 25 funktionellen Promotoren. Promotoren sind wichtige Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie, um die Expression bestimmter Gene in einer transgenen Pflanze zu steuern und so bestimmte Wesensmerkmale der Pflanze zu erzielen.

30 Verschiedene in Pflanzen funktionelle Promotoren sind bekannt, zum Beispiel konstitutive Promotoren wie der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobakterium, der TR-Doppelpromotor oder der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812). Nachteilig bei diesen 35 Promotoren ist, dass sie in fast allen Geweben der Pflanze konstitutiv aktiv sind. Eine gezielte Expression von Genen in bestimmten Pflanzenteilen oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten ist mit diesen Promotoren nicht möglich. Besonders groß ist daher der Bedarf an Promotoren mit einem definierten Aktivitätsprofil und einer Spezifität für bestimmte pflanzliche Gewebe. 40

Beschrieben sind Promotoren mit Spezifitäten für verschiedene pflanzliche Gewebe wie Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen. Die Stringenz der Spezifität, als auch die Expressionsaktivität dieser Promotoren ist sehr 45 unterschiedlich.

## 2

Die pflanzliche Blüte dient der geschlechtlichen Fortpflanzung der Samenpflanzen. Pflanzliche Blüten - vor allem die Blütenblätter (Petalen) - akkumulieren häufig große Mengen sekundärer Pflanzenstoffe, wie beispielsweise Terpene, Anthocyane, Carotinoide, Alkaloide und Phenylpropanoide, die der Blüte als Duftstoffe, Abwehrstoffe oder als Farbstoffe dienen. Viele dieser Substanzen sind von ökonomischem Interesse. Zudem ist die Blütenknospe und die Blüte der Pflanze ein empfindliches Organ, besonders gegen Stressfaktoren wie Kälte.

10

Blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoensynthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der Promoter des APETALA3 Gens (Hill TA et al. (1998) Development 125:1711-1721) sind bekannt. Diese Promotoren weisen jedoch alle einen oder mehrere Nachteile auf, die eine breite Nutzung beeinträchtigen:

1) Sie sind innerhalb der Blüte spezifisch für ein oder mehrere Blütengewebe und gewährleisten nicht die Expression in allen Geweben der Blüte.

20

2 Sie sind - wie im Beispiel des an der Blütenentwicklung beteiligten APETALA3 Gens - während der Blütenentwicklung stark reguliert und nicht zu allen Phasen der Blütenentwicklung aktiv.

25

3) Sie zeigen mitunter starke Nebenaktivitäten in anderen pflanzlichen Geweben.

30 Trotz der Vielzahl bekannter pflanzlicher Promotoren, besteht ein Bedarf an Promotoren mit einer Spezifität für die pflanzliche Blüte, die über einen langen Zeitraum der Blütenentwicklung und Blüte eine hohe Expression gewährleisten.

35 Es bestand daher die Aufgabe, Verfahren und geeignete Promotoren für die gezielte, transgene Expression von Nukleinsäuren in den Blütengeweben bereitzustellen. Diese Aufgabe wurde durch Bereitstellung von Promotoren der  $\epsilon$ -Cyclase gelöst. Diese Promotoren zeigen eine ungewöhnliche starke Expression in zahlreichen

40 Blütenorganen.

## 3

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der in der pflanzlichen Blüte, wobei nachfolgende Schritte umfasst sind

5

I. Einbringen einer transgenen Expressionskassette in pflanzliche Zellen, wobei die transgene Expressionskassette mindestens nachfolgende Elemente enthält

10 a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und

b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und

15 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine der besagten Promotorsequenzen und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz oder die pflanzliche Zelle heterolog ist, und

20

II. Auswahl von transgenen Zellen, die besagte Expressionskassette stabil in das Genom integriert enthalten, und

25 III. Regeneration von vollständigen Pflanzen aus besagten transgenen Zellen, wobei mindestens eine der weiteren Nukleinsäuresequenz in der Blüte exprimiert wird.

Ein weiterer Gegenstand betrifft transgene Expressionskassetten, wie sie z.B. in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommen können. Bevorzugt umfassen die transgenen Expressionskassetten zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte,

30 a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und

b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und

40 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz

45 heterolog ist.



In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens und/oder der erfindungsgemäßen Expressionskassetten meint "Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase" eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus

5

- i) der Promotorsequenz der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* gemäß SEQ ID NO: 7, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa* gemäß SEQ ID NO: 8, und

10

- ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 und

15

- iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

- 20 Besonders bevorzugt meint "Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase" die Promotorsequenz aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 und funktionell äquivalente Fragmente derselben.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können weiteren

- 25 genetischen Kontrollsequenzen und/oder zusätzliche Funktionselemente enthalten.

Bevorzugt können die transgenen Expressionskassetten durch die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz die Expression

- 30 eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, und/oder die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense-RNA, anti-sense-RNA oder doppelsträngigen RNA ermöglichen.

- 35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgener Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Expressionskassette enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene

- 40 Organismen, die eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren enthalten. Der Organismus kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, nicht-menschlichen tierischen und pflanzlichen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe,
- 45 Organe oder Vermehrungsgut, bevorzugt ist der Organismus ausgewählt aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.

## 5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher eine isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 sowie funktionell äquivalente Fragmente derselben.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. die erfindungsgemäße transgenen Expressionskassette in Form einer funktionell äquivalenten Promotorsequenz neben der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 zudem noch  
10 die Sequenz kodierend für die 5'-untranslatierte Region des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens aus *Tagetes erecta*. Besonders bevorzugt ist die durch SEQ ID NO: 2 beschriebene Sequenz.

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst die  
15 erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. die erfindungsgemäße transgenen Expressionskassette in Form einer funktionell äquivalenten Promotorsequenz neben der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 zudem noch die Sequenz kodierend für die 5'-untranslatierte Region des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens aus *Tagetes erecta* und eine Sequenz kodierend  
20 für ein Transitpeptid, bevorzugt für das Transitpeptid des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 4. Bevorzugt ist diese Sequenz in 3'-Richtung in Bezug auf einen der erfindungsgemäßen Promotoren orientiert. Als Promotorsequenz in diesem Zusammenhang besonders bevorzugt ist die durch  
25 SEQ ID NO: 3 beschriebene Sequenz.

Ein weiterer Gegenstand betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen, transgenen Expressionsvektoren oder transgenen Organismen zur transgenen Expression von  
30 Nukleinsäuren und/oder Proteinen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz zur Verminderung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase. In diesem Rahmen sind Expressions-  
35 kassetten erfindungsgemäß umfasst, die eine zu der Promotorsequenz korrespondierende doppelsträngige RNA zu exprimieren vermögen.

Insbesondere bevorzugt ist die Verwendung der besagten trans-  
40 genen Organismen oder von diesem abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wobei die Feinchemikalien bevorzugt Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fett-  
45 säuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe sind. Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Herstellung besagter Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut,

## 6

Pharmazeutika oder Feinchemikalien unter Einsatz der erfindungsgemäßen transgenen Organismen oder von diesen abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut.

5

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten sind aus nachfolgendem Grund besonders vorteilhaft:

- 10 a) Sie gewähren eine selektive Expression in der Blüte von Pflanze und ermöglichen zahlreiche Anwendungen, wie beispielsweise eine Resistenz gegen Stressfaktoren wie Kälte oder eine gezielte Synthese von sekundären Pflanzenstoffen. Die Expression erfolgt über den gesamten Entwicklungszeitraum der Blüte mit hoher Aktivität.

15

"Expression" meint die Transkription der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, kann aber - im Falle eines offenen Leserahmens in "sense"-Orientierung - auch die Translation der transkribierten RNA der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz  
20 in ein korrespondierendes Polypeptid mit einschließen.

"Transgen" meint - beispielsweise in Bezug auf eine transgene Expressionskassette, einen transgenen Expressionsvektor, einen transgenen Organismus oder Verfahren zur transgenen Expression  
25 von Nukleinsäuren - alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene Konstruktionen oder Verfahren unter Verwendung derselben, in denen entweder

- 30 a) ein  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor (z.B. gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Fragment der vorgenannten, oder
- b) die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor gemäß a), oder
- 35 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei  
40 die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Bevorzugt ist die in den Expressionskassetten enthaltene erfindungsgemäße Promotorsequenz (z.B. die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) heterolog in Bezug auf die  
45 mit ihr funktionell verknüpfte, transgen zu exprimierende weitere Nukleinsäuresequenz. "Heterolog" meint in diesem Zusammenhang, dass die weitere Nukleinsäuresequenz nicht für das Gen kodiert,

das natürlicherweise unter der Kontrolle des besagten Promotors steht.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromo-  
5 somalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in  
einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Biblio-  
thek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäure-  
sequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung  
flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und  
10 hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens  
500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders  
bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommendes  
Expressionskonstrukt - beispielsweise die natürlich vorkommende  
Kombination des Promotors gemäß SEQ ID NO: 1 und eines Gens  
15 kodierend für ein Protein gemäß SEQ ID NO: 10 oder 12 wird zu  
einem transgenen Expressionskonstrukt, wenn diese durch nicht-  
natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispiels-  
weise einer in vitro Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende  
Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch  
20 oben).

"Transgen" meint in Bezug auf eine Expression ("transgene  
Expression") bevorzugt all solche unter Einsatz einer transgenen  
Expressionskassette, transgenen Expressionsvektor oder transgenen  
25 Organismus - entsprechend dem oben gegebenen Definitionen -  
realisierten Expressionen.

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten, die  
von ihnen abgeleitete transgenen Expressionsvektoren und trans-  
30 genen Organismen können funktionelle Äquivalente zu den unter  
SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenz  
umfassen.

Funktionelle Äquivalente umfasst auch all die Sequenzen, die von  
35 dem komplementären Gegenstrang der durch SEQ ID NO: 1, 7 oder  
8 definierten Sequenzen abgeleitet sind und im wesentlichen die  
gleiche Promotoraktivität aufweisen. Besonders bevorzugt sind  
die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2 oder 3 umfasst, die neben der  
Promotorsequenz die 5'-untranslatierte Region bzw. die 5'-un-  
40 translatierte Region und die Region kodierend für das Transit-  
peptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* enthalten.

Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder  
künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrie-  
45 benen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenz sowie deren Homologen aus anderen  
Pflanzengattungen und -arten, welche weiterhin im wesentlichen

## 8

die gleiche Promotoraktivität wie der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 aufweisen.

Eine Promotoraktivität wird im wesentlichen als gleich bezeichnet, wenn die Transkription eines bestimmten zu exprimierenden Gens unter Kontrolle von z.B. eines funktionellen Äquivalentes der durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenz oder eines funktionell äquivalenten Fragmentes derselben - unter ansonsten unveränderten Bedingungen - in mindestens einem Blüten-Gewebe höher ist als in einem anderen Nicht-Blüten Gewebe, beispielsweise der Wurzel oder den Blättern. Dabei beträgt die Expression unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren in einem Blüten-Gewebe bevorzugt mindestens das doppelte oder das fünffache, ganz besonders bevorzugt mindestens das zehnfache oder das fünfzigfache, am meisten bevorzugt mindestens das hundertfache als in einem anderen Nicht-Blüten Gewebe, beispielsweise der Wurzel oder den Blättern.

"Blüte" meint allgemein einen Spross begrenzten Wachstums, dessen Blätter zu Fortpflanzungsorganen umgewandelt sind. Die Blüte besteht aus verschiedenen "Blütengeweben" wie z.B. den Kelchblätter (Sepalen), den Kronblätter (Petalen), den Staubblätter (oder Staubgefäßen"; Stamina) oder den Fruchtblätter (Karpellen). Als Androeceum wird in der Blüte die Gesamtheit der Staubblätter (Stamina) bezeichnet. Die Staubblätter befinden sich innerhalb des Petalen- bzw. Sepalenkreises. Ein Staubblatt gliedert sich in ein Filament und eine am Ende sitzende Anthere. Diese wiederum unterteilt sich in zwei Theken, welche durch ein Konnektiv miteinander verbunden sind. Jede Theke besteht aus je zwei Pollensäcken, in denen der Pollen gebildet wird.

"Gezielt" meint in Bezug auf die Expression in der pflanzlichen Blüten bevorzugt, dass die Expression unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren in mindestens einem pflanzlichen Blütengewebe mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das fünfzigfache, ganz besonders bevorzugt bevorzugt mindestens das hundertfache beträgt als in einem Nicht-Blütengewebe wie beispielsweise den Blättern.

Bevorzugt werden im Rahmen der Ermittlung der Expressionshöhe solche Sequenzen eingesetzt, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporterproteine (Schenborn E, Groskreutz D. (1999) Mol Biotechnol 13(1): 29-44) wie "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques 23(5):912-8), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414),  $\beta$ -Glucuronidase

oder  $\beta$ -Galactosidase. Ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

- "Ansonsten unveränderte Bedingungen" bedeutet, dass die
- 5 Expression, die durch eine der zu vergleichenden transgenen Expressionskassetten initiiert wird, nicht durch Kombination mit zusätzlichen genetischen Kontrollsequenzen, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, modifiziert wird. Unveränderte Bedingungen bedeutet ferner, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise
- 10 Pflanzenart, Entwicklungsstadium der Pflanzen, Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate etc.) zwischen den zu vergleichenden Expressionen identisch gehalten werden.
- 15 Funktionelle Äquivalente zu dem  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 umfasst bevorzugt solche Sequenzen die
- a) im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 aufweisen und
- 20 b) die eine Homologie aufweisen von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz des der  $\epsilon$ -Cyclase-
- 25 Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8, wobei sich die Homologie über eine Länge von mindestens 100 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 200 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 300 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 400 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von
- 30 mindestens 500 Basenpaaren erstreckt.

- Dabei kann die Expressionshöhe der funktionellen Äquivalente sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Vergleichswert abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen,
- 35 deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten mit denen durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen
- 40 Promotoren unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders
- 45 bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten mit dem durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotor übersteigt.

## 10

- Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Expressionsvektoren zum Einsatz kommenden funktionell äquivalenten Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische
- 5 Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthium annuus*, *Linum sativum* oder *Oryza sativa* durch Homologievergleiche in Datenbanken leicht auffinden. Bevorzugt kann man dazu von den kodierenden Regionen des Gens aus-
- 10 gehen, dessen Promotor durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrieben ist. Ausgehend von beispielsweise den cDNA Sequenzen dieser Gene beschrieben durch SEQ ID NO: 9, 11, 13 oder 15 oder den davon abgeleiteten Proteinsequenz beschrieben durch SEQ ID NO: 10, 12, 14 oder 16 können die entsprechenden homologen Gene - und damit
- 15 die zugehörigen Promotorregionen - in anderen Pflanzenarten durch Durchmusterung von Datenbanken oder Genbanken (unter Verwendung von entsprechenden Gensonden) leicht in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.
- 20 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfassen funktionelle Äquivalente zu dem  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 solche Sequenzen, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodiert.
- 25  $\epsilon$ -Cyclase meint allgemein all solche Proteine, die eine  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase
- 30 verstanden.
- Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.
- 35 Insbesondere meint  $\epsilon$ -Cyclase allgemein all solche Proteine, die befähigt sind, die Ringbildung von Lycopin zu  $\delta$ -Carotin (und gegebenenfalls weiter zu  $\epsilon$ -Carotin) und/oder von Neurosporen zu  $\alpha$ -Zeacarotin zu katalysieren. Bevorzugt hat die  $\epsilon$ -Cyclase eine
- 40 Oxidoreduktase-Aktivität und/oder zeigt natürlicherweise eine überwiegende Lokalisation in den Plastiden insbesondere den Chloroplasten und Chromoplasten.
- Bevorzugt wird unter einer  $\epsilon$ -Cyclase ein Protein verstanden,
- 45 das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln. Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in

## 11

einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

- 5 Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

10 Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben werden.

- 15 Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Arch Biochem Biophys 346(1) (1997) 53-64): Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0,25 ml durchgeführt. Der Ansatz ent-  
20 hält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0,25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0,2 mM NADP+, 0,2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0,01 ml Ethanol mit 1 mg Tween  
25 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

- 30 Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem Biophys Res Comm 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (J Biol Chem 266(26) (1991) 17072-17078).

- 35 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen funktionelle Äquivalente des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase mit einer Homologie  
40 von mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 % zu einem Protein gemäß SEQ ID NO: 10, 12, 14 oder 16 kodieren, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomischen Sequenz darstellen.



## 12

- Besonders bevorzugt umfassen funktionelle Äquivalente des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine
- 5 Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 % zu der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 9, 11, 13 oder 15 hat, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der
- 10 besagten genomischen Sequenz darstellen und die cDNA für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodiert.

- Bevorzugt sind Promotoren, die einen Sequenzbereich von mindestens 250 Basenpaare, bevorzugt mindestens 500 Basenpaare,
- 15 besonders bevorzugt 1000 Basenpaare, am meisten bevorzugt mindestens 2000 Basenpaare in 5'-Richtung gerechnet vom ATG-Startkodon der besagten genomischen Sequenzen umfassen.

- Besonders bevorzugt sind funktionelle Äquivalente des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodiert, die mindestens eines der nachfolgenden Sequenzmotive enthält:

- 25
- |       |                            |                 |
|-------|----------------------------|-----------------|
| 1.    | G(G/C)GPAGL(A/S)(V/L)A     | (SEQ ID NO: 17) |
| 2.    | (L/I)(N/G/S)RXYG(K/R)(V/L) | (SEQ ID NO: 18) |
| 3.    | MVFMD(Y/W)RD               | (SEQ ID NO: 19) |
| 4.    | PTFLY(A/V)M(P/A)           | (SEQ ID NO: 20) |
| 30 5. | AXMVHP(S/A)TGY(M/S)V(A/V)R | (SEQ ID NO: 21) |
| 6.    | LWDER(R/K)RQRXF            | (SEQ ID NO: 22) |

- Ganz besonders bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche für ein Protein kodiert, wobei besagtes Protein mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

- 40 1. die homologe Sequenz (H1) aus *Lactuca sativa* gemäß SEQ ID NO: 24,
2. die homologen Sequenzen (H2 und H3) aus *Adonis palaestina* gemäß SEQ ID NO: 26 oder 28,
3. die homologe Sequenz (H4) aus *Arabidopsis thaliana* gemäß
- 45 SEQ ID NO: 30
4. die homologe Sequenzen (H5 und H6) aus *Citrus x paradisi* gemäß SEQ ID NO: 32 oder 34

## 13

5. die homologe Sequenz (H7) aus *Citrus sinensis* gemäß  
SEQ ID NO: 36
6. die homologe Sequenz (H8) aus *Spinacea oleracea* gemäß.  
SEQ ID NO: 38
- 5 7. die homologe Sequenz (H9) aus *Solanum tuberosum* gemäß  
SEQ ID NO: 40
8. die homologen Sequenzen (H10 und H11) aus *Daucus carota* gemäß  
SEQ ID NO: 42 oder 44
9. die homologe Sequenz (H12) aus Tomate gemäß SEQ ID NO: 46

10

Am meisten bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche  
15 für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

1. die homologe Sequenz (H1) aus *Lactuca sativa* gemäß  
SEQ ID NO: 23,
- 20 2. die homologen Sequenzen (H2 und H3) aus *Adonis palaestina*  
gemäß SEQ ID NO: 25 oder 27,
3. die homologen Sequenzen (H4) aus *Arabidopsis thaliana* gemäß  
SEQ ID NO: 29
4. die homologe Sequenzen (H5 und H6) aus *Citrus x paradisi*  
gemäß SEQ ID NO: 31 oder 33
- 25 7. die homologe Sequenz (H7) aus *Citrus sinensis* gemäß  
SEQ ID NO: 35
5. die homologe Sequenz (H8) aus *Spinacea oleracea* gemäß  
SEQ ID NO: 37
- 30 6. die homologe Sequenz (H9) aus *Solanum tuberosum* gemäß  
SEQ ID NO: 39
8. die homologen Sequenzen (H10 und H11) aus *Daucus carota* gemäß  
SEQ ID NO: 41 oder 43
9. die homologe Sequenz (H12) aus Tomate gemäß SEQ ID NO: 45

35

Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Expressionsvektoren zum Einsatz kommenden funktionell äquivalenten Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische  
40 Sequenz zumindest teilweise bekannt ist, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthium annuus*, *Linum sativum* durch Homologievergleiche in Datenbanken leicht auffinden.

- 45 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz oder eines Teils derselben in Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren

## 14

von Genen, die für besagte Nukleinsäuresequenz kodieren, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens ein Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine für diese Sequenzmotive angegebene Variation 5 umfasst. Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 oder 46. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 10 45. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen.

Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Identifikation 15 und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für einen Promotor mit Spezifität für die pflanzliche Blüte kodieren, wobei bei der Identifikation und/oder Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen 20 kodiert, die mindestens ein Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine für diese Sequenzmotive angegebene Variation umfasst. Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 oder 46. 25 Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 45. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen. In einer Bevorzugten Ausführungsform basiert das 30 erfindungsgemäße Verfahren auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.

35 Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, um ausgehend von einer Nukleinsäuresequenz (z.B. einem Gentranskript wie beispielsweise einer cDNA) den Promotor des entsprechenden Genes zu identifizieren und zu isolieren. Dazu stehen beispielsweise prinzipiell alle Methoden zur Amplifikation flankierender 40 chromosomaler Sequenzen zur Verfügung. Die beiden am häufigsten genutzten Verfahren sind die inverse PCR ("iPCR"; schematisch dargestellt in Fig. 13) und die "Thermal Asymmetric Interlaced PCR" ("TAIL PCR"). Geeignet ist ferner auch das Verfahren des "PCR Walkings" (Devic et al. (1997) Plant Physiol Biochem 45 35:331-339).

## 15

Für die "iPCR" wird genomische DNA des Organismus, aus dem der funktionell äquivalente Promotor zu isolieren ist, mit einem gegebenen Restriktionsenzym komplett verdaut und anschließend werden in einem verdünnten Ansatz die einzelnen Fragmente rück-  
5 ligiert, also mit sich selbst zu einem ringförmigen Molekül verbunden. In der Vielzahl entstehender ringförmiger DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die die bekannte Sequenz (beispielsweise die Sequenz kodierend für das homologe Protein) enthalten. Ausgehend davon kann das ringförmige Molekül mittels PCR amplifi-  
10 ziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem beide Primer sich an den bekannten Sequenzabschnitt anlagern können. Eine Ausführungsmöglichkeit für die "iPCR" ist beispielhaft in Beispiel 2 wiedergegeben.

15 Die "TAIL-PCR" beruht auf der Verwendung von einerseits einem Satz sukzessive verkürzter hochspezifischer Primer, die sich an die bekannte genomische Sequenz (beispielsweise die Sequenz kodierend für das homologe Protein) anlagern, und andererseits einem Satz kürzerer Zufallsprimer mit geringer Schmelztemperatur,  
20 so dass eine sequenzunspezifischere Anlagerung an die bekannte genomische Sequenz flankierende genomische DNA erfolgt. Die Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende DNA kann mit einer solchen Primerkombination so gestaltet werden, dass eine spezifische Amplifikation der gewünschten Zielsequenz möglich  
25 wird. Eine Ausführungsmöglichkeit für die "TAIL-PCR" ist beispielhaft in Beispiel 2 wiedergegeben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für  
30 die pflanzliche Blüten, umfassend nachfolgende Schritte:

- I. Isolation einer Promotorsequenz, wobei bei der Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine  
35 Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens ein Sequenzmotiv gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine für diese Sequenzmotive angegebene Variation umfasst.
- II. Funktionelle Verknüpfung besagter Promotorsequenz mit einer  
40 weiteren Nukleinsäuresequenz, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf den Promotor heterolog ist.

Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 24, 26,  
45 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 oder 46. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder

45. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen. In einer bevorzugten Ausführungsform basiert das erfindungsgemäße

- 5 Verfahren auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird. Im Rahmen der funktionellen Verknüpfung können dem Fachmann bekannte Verfahren wie z.B. Ligation etc. eingesetzt werden (s.u.).

10

Die Expressionshöhe eines funktionell äquivalenten Promotors kann sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der

- 15 transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten mit denen durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotoren unterscheidet. Besonders bevorzugt sind

- 20 solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten mit dem durch

- 25 SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotor übersteigt. Bevorzugt ist als Vergleichswert die Expressionshöhe der natürlicherweise von dem Promotor exprimierten mRNAs einer  $\epsilon$ -Cyclase oder des daraus resultierenden Proteins. Bevorzugt ist ferner als Vergleichswert die Expressionshöhe erhalten mit einer beliebigen,

- 30 aber bestimmten Nukleinsäuresequenz, bevorzugt solchen Nukleinsäuresequenzen, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E & Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996)

- 35 Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414) oder die  $\beta$ -Glucuronidase, ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

40

Funktionelle Äquivalente umfassen auch natürliche oder künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschriebenen Promotorsequenz. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversionen oder Insertionen eines oder mehrerer

- 45 Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors gemäß SEQ ID NO: 1,

## 17

7 oder 8 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen Sequenz oder z.B. auch das Einfügen oder Entfernen von Restriktionsendonukleaseschnittstellen, die Entfernung überflüssiger DNA oder das Hinzufügen weiterer 5 Sequenzen, zum Beispiel weiterer regulatorischer Sequenzen, sein.

Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B. Transitionen und Transversionen, in Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", 10 Restriktion oder Ligation verwendet werden. Transition meint einen Basenpaaraustausch eines Purin/Pyrimidin-Paares in ein anderes Purin/Pyrimidin-Paar (z.B. A-T gegen G-C). Transversion meint einen Basenpaaraustausch eines Purin/Pyrimidin-Paares gegen ein Pyrimidin/Purin-Paar (z.B. A-T gegen T-A). Deletion meint die 15 Entfernung eines oder mehrerer Basenpaare. Insertion meint die Einführung eines oder mehrerer Basenpaare.

Durch Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "blunt ends" können komplementäre 20 Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. Zu analogen Ergebnissen kann man auch unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer kommen.

25 Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung 30 folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

35

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programm- 40 algorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge ver- 45 standen, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin,

## 18

Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

5

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 60 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 10 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 10 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 60 % aufweist.

Funktionelle Äquivalente meint ferner DNA Sequenzen, die unter Standardbedingungen mit der Nukleinsäuresequenz kodierend für den  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 oder der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und die im wesentlichen gleichen Promotoreigenschaften haben. Der Begriff der Standardhybridisierungsbedingungen ist breit zu verstehen und meint sowohl stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrille sind infolge gegeben:

45

## 19

## (1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

- a) 4X SSC bei 65°C, oder
- 5 b) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 65°C, oder
- c) 4X SSC, 50 % Formamid, bei 42°C, oder
- d) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung), oder
- 10 e) 2X oder 4X SSC, 30 bis 40 % Formamid bei 42°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 6x SSC bei 45°C, oder,
- g) 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 2 mM EDTA, 1 % BSA und 7 % SDS.

## 15 (2) Waschschritte mit zum Beispiel

- a) 0,1X SSC bei 65°C, oder
- b) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C, oder
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder
- 20 d) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C, oder
- e) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 1 % SDS, 2 mM EDTA.

Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer funktioneller Äqui-  
25 valente umfassen bevorzugt die Einführung von Mutationen in den ε-Cyclase-Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8. Eine Mutagenese kann ungerichtet ("random") erfolgen, wobei die mutagenisierten Sequenzen anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften nach einer "trial-and-error" Prozedur durchmustert werden. Besonders vor-  
30 teilhafte Selektionskriterien umfassen beispielsweise die Höhe der resultierenden Expression der eingeführten Nukleinsäuresequenz in einem Blüten-Gewebe.

Verfahren zur Mutagenisierung von Nukleinsäuresequenzen sind dem  
35 Fachmann bekannt und schließen beispielhaft die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer oder mehr Mutationen im Vergleich zu der zu mutierenden Region ein (z.B. im Rahmen einer "Site-specific mutagenesis"). Typischerweise kommen Primer mit ungefähr 15 bis ungefähr 75 Nukleotiden oder mehr zum Einsatz, wobei  
40 bevorzugt ca. 10 bis ca. 25 oder mehr Nukleotidreste an beiden Seiten der zu verändernden Sequenz lokalisiert sind. Details und Durchführung besagter Mutageneseverfahren sind dem Fachmann geläufig (Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol 154:367-382; Tomic et al. (1990) Nucl Acids Res 12:1656; Upender et al. (1995)  
45 Biotechniques 18(1):29-30; US 4,237,224). Eine Mutagenese kann auch durch Behandlung von beispielsweise transgenen Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen



enthalten, mit mutagenisierenden Agentien wie Hydroxylamin realisiert werden.

Alternativ können nicht-essentielle Sequenzen eines erfindungs-  
5 gemäßen Promotors deletiert werden, ohne die genannten wesent-  
lichen Eigenschaften signifikant zu beeinträchtigen. Derartige  
Deletionsvarianten stellen funktionell äquivalente Fragmente  
zu den Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 oder  
zu funktionellen Äquivalentes derselben dar. Die Eingrenzung  
10 der Promotorsequenz auf bestimmte, essentielle regulatorische  
Regionen kann z.B. mit Hilfe von Suchroutine zur Suche von  
Promotorelementen vorgenommen werden. Oft sind in den für  
die Promotoraktivität relevanten Regionen bestimmte Promotor-  
elemente gehäuft vorhanden. Diese Analyse kann beispielsweise  
15 mit Computerprogrammen wie dem Programm PLACE ("Plant Cis-acting  
Regulatory DNA Elements"; Higo K et al. (1999) Nucl Acids Res  
27(1): 297-300), der BIOBASE Datenbank "Transfac" (Biologische  
Datenbanken GmbH, Braunschweig; Wingender E et al. (2001) Nucleic  
Acids Res 29(1):281-3) oder Datenbank PlantCARE (Lescot M et al.  
20 (2002) Nucleic Acids Res 30(1):325-7) vorgenommen werden.

Bevorzugt umfassen die funktionell äquivalenten Fragmente eines  
der erfindungsgemäßen Promotoren - beispielsweise der  $\epsilon$ -Cyclase-  
Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 - mindestens  
25 200 Basenpaar, ganz besonders bevorzugt mindestens 500 Basen-  
paare, am meisten bevorzugt mindestens 1000 Basenpaare des  
3'-Endes des jeweiligen erfindungsgemäßen Promotors - beispiels-  
weise der Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8  
-, wobei die Länge vom Translationsstart ("ATG"-Kodon) in  
30 5'-Richtung stromaufwärts gerechnet wird.

Weitere funktionell äquivalente Fragmente können beispielsweise  
durch Deletion eventuell noch vorhandener 5'-untranslatierter  
Bereiche erzeugt werden. Zu diesem Zweck kann der Transkriptions-  
35 start der entsprechenden Gene durch dem Fachmann geläufige Ver-  
fahren (wie beispielsweise 5'-RACE) bestimmt und die 5'-untrans-  
latierten durch PCR-vermittelte Methoden oder Endonukleaseverdau  
deletiert werden. So können beispielsweise die in den Promotoren  
gemäß SEQ ID NO: 7 oder 8 umfassten 5'-untranslatierten Regionen  
40 deletiert werden, ohne dass der Promotor seine wesentliche  
Funktionalität verliert. Entsprechende Deletionsvarianten sind  
ausdrücklich als funktionelle Äquivalente umfasst.

## 21

In erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten steht mindestens einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

5

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) mit einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf.

- 10 weiterer genetischer Kontrollsequenzen wie zum Beispiel einem Terminator oder einer Polyadenylierungssequenz derart, dass der Promotor seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz unter geeigneten Bedingungen erfüllen kann und die Expression der Nukleinsäuresequenz (d.h. Transkription
- 15 und gegebenenfalls Translation) erfolgt. "Geeignete Bedingungen" meint dabei bevorzugt das Vorliegen der Expressionskassette in einer pflanzlichen Zelle, bevorzugt einer pflanzlichen Zelle umfasst von einem pflanzlichen Blüte.

- 20 Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter einem der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der
- 25 Promotorsequenz und der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

- 30 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines transgenen Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
- 35 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) und in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience beschrieben sind.
- 40 Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das trans-
- 45 gene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert

in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8), ohne dass er zuvor notwendigerweise mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft wurde, zum Beispiel über eine gezielte homologe Rekombination oder eine zufällige Insertion in ein Wirtsgenom eingeführt wird, dort regulatorische Kontrolle über mit ihm dann funktionell verknüpfte endogene Nukleinsäuresequenzen übernimmt und die transgene Expression derselben steuert. Durch Insertion des Promotors - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor eine für ein bestimmtes Polypeptid kodierende Nukleinsäure erhält man eine erfindungsgemäße Expressionskassette, die die Expression des bestimmten Polypeptides gezielt in der pflanzlichen Blüte steuert. Auch kann beispielsweise der natürliche Promotor eines endogenen Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) ausgetauscht und so das Expressionsverhalten des endogenen Gens modifiziert werden.

Ferner kann die Insertion des Promotors auch derart erfolgen, dass antisense-RNA oder eine doppelsträngige RNA (z.B. in Form eines invertierten "Repeats") zu der für ein bestimmtes Polypeptid kodierenden Nukleinsäure exprimiert wird. Damit wird selektiv die Expression des bestimmten Polypeptides in der pflanzlichen Blüte herunterreguliert oder ausgeschaltet.

Analog kann auch eine transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - hinter die Sequenz kodierend für einen der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 7 oder 8), die sich in ihrem natürlichen chromosomalen Kontext befindet, so plziert werden, dass man eine erfindungsgemäße Expressionskassette erhält, die die Expression der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz in der pflanzlichen Blüte steuert.

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten können weitere genetische Kontrollsequenzen umfassen. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion einer erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten 3'-stromab-

wärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen  
5 zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch  
10 genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989)  
15 Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen  
20 Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Promotoren kommen im Prinzip alle in Pflanzen funktionelle Promotoren in Frage. In Pflanzen funktionelle Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen,  
25 -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind konstitutive Promotoren, gewebespezifische Promotoren, entwicklungsabhängige Promotoren, chemisch-induzierbare stress-induzierbare oder pathogen-induzierbare Promotoren.  
30 Entsprechende Promotoren sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren gram-positiver Bakterien wie amy und SPO2 oder in den  
35 Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH zu finden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungs-  
40 gemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von  
45 Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)), bevorzugt

- der Gene mit dem Genlocus At2g46720, At3g01980 und At1g63140 aus *Arabidopsis thaliana*. Es kann gezeigt werden, dass derartige Regionen eine signifikante Funktion bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440). Die unter SEQ ID NO: 2, 7 oder 8 angegebenen Nukleinsäuresequenzen repräsentieren jeweils die Promotorregion und die 5'-untranslatierte Regionen bis zum ATG-Startcodon der jeweiligen Gene.
- 15 Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können
- 20 zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.
- 25 Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der
- 30 NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom

35 erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die für eine dsRNA kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung des trans-

40 genen Expressionskonstruktes aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

- 45 Eine transgene Expressionskassette und/oder die von ihm abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist

## 25

breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren oder der transgenen Organismen haben.

5 Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide wie Metabolismusinhibitoren (z.B. 2-Desoxyglucose-6-phosphat; WO 98/45456), Antibiotika (z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin, 10 Hygromycin) oder - bevorzugt - Herbizide (z.B. Phosphino-tricin) verleihen. Als Selektionsmarker seien beispielhaft genannt: Phosphinothricinacetyltransferasen (bar und pat Gen), welche Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren, 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasen (EPSP Synthase- 15 gene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, Glyphosat® degradierende Enzyme (gox-Genprodukt; Glyphosatoxidoreduktase), Dehalogenasen, welche z.B. Dalapon inaktivieren (deh Genprodukt), Sulfonyl-urea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen 20 sowie Nitrilasen, welche z.B. Bromoxynil degradieren (bxn Genprodukt), das aasa-Genprodukt, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, Streptomycinphosphotransferasen (SPT), die eine Resistenz gegen Streptomycin gewähren, Neomycinphosphotransferasen (NPTII), die eine 25 Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleihen, das Hygromycinphosphotransferasen (HPT), die eine Resistenz gegen Hygromycin vermitteln, das Acetolactatsynthasen (ALS), die eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleihen (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra 30 Mutation).
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine 35 Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luzi- 40 ferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

- c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielfhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication),  
5 der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentrans-  
10 formation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

"Einführen" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet sind, eine Nukleinsäuresequenz (beispielsweise eine  
15 erfindungsgemäße Expressionskassette) direkt oder indirekt, in einen Organismus (z.B. ein Pflanze) oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial (z.B. Samen oder Früchte) derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Das Einbringen kann  
20 zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Nukleinsäuresequenz führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen). Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation. Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem  
25 Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet.

Das Einführen einer erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche  
30 Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskassetten enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Die transgenen Expressionskassetten können in  
35 den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle insertiert werden. Der entstandene Vektor kann zunächst in E.coli eingeführt und amplifiziert werden. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem Fachmann geläufigen  
40 Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

- 45 Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die

entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann

5 die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch

10 Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zum Einführen von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind

15 beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) *Gene* 100:247-250; Scheid et al. (1991) *Mol Gen Genet* 228:104-112; Guerche et al. (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhauser et al. (1987) *Theor Appl Genet* 75:30-36; Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-73; Howell et al. (1980) *Science* 208:1265; Horsch et

20 al. (1985) *Science* 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

25

Als Vektoren zur Expression in *E. coli* sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); pTrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5

30 (Pharmacia Biotech, Inc.).

Bevorzugte Vektoren zur Expression in Säugerzellen umfassen pWLNE0, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG (Stratagene Inc.); pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL (Pharmacia Biotech, Inc.). Als induzierbare

35 Vektoren seien pTet-tTak, pTet-Splice, pCDNA4/TO, pCDNA4/TO / LacZ, pCDNA6/TR, pCDNA4/TO/Myc-His/LacZ, pCDNA4/TO/Myc-His A, pCDNA4/TO/Myc-His B, pCDNA4/TO/Myc-His C, pVgRXR (Invitrogen, Inc.) oder die pMAM-Serie (Clontech, Inc.; GenBank Accession No.: U02443) zu nennen. Diese stellen bereits das induzierbare

40 regulatorische Kontrollelement beispielsweise für eine chemisch, induzierbare Expression zur Verfügung.

Vektoren für die Expression in Hefe umfassen beispielhaft pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9,

45 pPIC3.5, PHIL-D2, PHIL-S1, pPIC3SK, pPIC9K, und PA0815 (Invitrogen, Inc.).



Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation von Ciliaten und Algen sind dem Fachmann bekannt (WO 98/01572; Falciatore et al. (1999) Marine Biotechnology 1(3):239-251; Dunahay et al. (1995) J Phycol 31:10004-1012).

5

Prinzipiell sind für die Transformation tierischer Zellen oder von Hefezellen ähnliche Verfahren wie für die "direkte" Transformation von pflanzlichen Zellen anzuwenden. Insbesondere Verfahren wie die Calciumphosphat oder Liposomen vermittelte Transformation oder aber Elektroporation sind bevorzugt.

10

Verschiedene Methoden und Vektoren zum Einschleusen von Genen in das Genom von Pflanzen sowie zur Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen sind bekannt (Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); White FF (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und Wu R, Academic Press, 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225; Halford NG, Shewry PR (2000) Br Med Bull 56(1):62-73). Dazu zählen beispielhaft die oben erwähnten. Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Calciumphosphat-vermittelte Transformation, DEAE-Dextran-vermittelte Transformation, Liposomen-vermittelte Transformation (Freeman et al. (1984) Plant Cell Physiol. 29:1353ff; US 4,536,475), biolistische Verfahren mit der Genkanone ("particle bombardment" Methode; US 5,100,792; EP-A 0 444 882; EP-A 0 434 616; Fromm ME et al. (1990) Bio/Technology 8(9):833-9; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603), die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, Elektroporation (EP-A 290 395, WO 87/06614), Mikroinjektion (WO 92/09696, WO 94/00583, EP-A 0 331 083, EP-A 0 175 966) oder andere Methoden der direkten DNA-Einführung (DE 4 005 152, WO 90/12096, US 4,684,611). Physikalische Methoden der DNA-Einführung in pflanzliche Zellen sind im Überblick dargestellt bei Oard (1991) Biotech Adv 9:1-11.

Im Falle dieser "direkten" Transformationsmethoden sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe, pBR322, M13mp Reihe, pA-CYC184 etc. können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen

45

aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

- 5 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobakterium (z.B. EP 0 116 718), virale Infektion mittels viraler Vektoren (EP 0 067 553; US 4,407,956; WO 95/34668; WO 93/03161) oder mittels Pollen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4,684,611) durchgeführt  
10 werden.

Bevorzugt erfolgt die Transformation mittels Agrobakterien, die "entwaffnete" (disarmed) Ti-Plasmidvektoren enthalten, wobei deren natürliche Fähigkeit zum Gentransfer auf Pflanzen genutzt  
15 wird (EP-A 0 270 355; EP-A 0 116 718).

Agrobakterium-Transformation ist weit verbreitet für die Transformation von Dicotyledonen, wird aber auch zunehmend auf Monocotyledonen angewandt (Toriyama et al. (1988) Bio/Technology 6:  
20 1072-1074; Zhang et al. (1988) Plant Cell Rep 7:379-384; Zhang et al. (1988) Theor Appl Genet 76:835-840; Shimamoto et al. (1989) Nature 338:274-276; Datta et al. (1990) Bio/Technology 8: 736- 740; Christou et al. (1991) Bio/Technology 9:957-962; Peng et al. (1991) International Rice Research Institute, Manila,  
25 Philippines 563-574; Cao et al. (1992) Plant Cell Rep 11:585-591; Li et al. (1993) Plant Cell Rep 12:250-255; Rathore et al. (1993) Plant Mol Biol 21:871-884; Fromm et al. (1990) Bio/Technology 8:833-839; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603-618; D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505; Walters et al.  
30 (1992) Plant Mol Biol 18:189-200; Koziel et al. (1993) Bio-technology 11:194-200; Vasil IK (1994) Plant Mol Biol 25:925-937. Weeks et al. (1993) Plant Physiol 102:1077-1084; Somers et al. (1992) Bio/Technology 10:1589-1594; WO 92/14828; Hiei et al. (1994) Plant J 6:271-282).

35

Die für die Agrobakterium-Transformation meist verwendeten Stämme Agrobakterium tumefaciens oder Agrobakterium rhizogenes enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach Agrobakterium-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids,  
40 genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Alternativ können durch Agrobakterium auch binäre Vektoren (Mini-Ti-Plasmide) auf Pflanzen übertragen und in deren Genom integriert werden.

- 45 Die Anwendung von Agrobakterium tumefaciens für die Transformation von Pflanzen unter Verwendung von Gewebekultur-explantaten ist beschrieben (u.a. Horsch RB et al. (1985)

Science 225:1229ff.; Fraley et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 4803-4807; Bevans et al. (1983) Nature 304:184-187).

Viele Stämme von Agrobakterium tumefaciens sind in der Lage, genetisches Material - beispielsweise die erfindungsgemäßen

- 5 Expressionskassetten - zu übertragen, wie z.B. die Stämme EHA101[pEHA101], EHA105[pEHA105], LBA4404[pAL4404], C58C1[pMP90] und C58C1[pGV2260] (Hood et al. (1993) Transgenic Res 2:208-218; Hoekema et al. (1983) Nature 303:179-181; Koncz and Schell (1986) Gen Genet 204:383-396; Deblaere et al. (1985) Nucl Acids Res 13: 10 4777-4788).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen

- 15 binären Vektor. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet, die sowohl in E.coli als auch in Agrobakterium replizieren können. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobakterium 20 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobakterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobakterium 25 kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP-A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Ver- 30 schiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA; Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711), pBinAR, pPZP200 oder pPTV.

- 35 Die mit einem solchen Vektor transformierten Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Raps, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeig- 40 neten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist beschrieben (White FF (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for 45 Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant

## 31

Molec Biol 42:205-225). Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die integriert die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Expressionssysteme enthalten.

5

Stabil transformierte Zellen (d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten) können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker

- 10 kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen ein Biozid (z.B. ein Antibiotikum oder Herbizid (s.o.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Biozids zu überleben, die
- 15 einen untransformierten Wildtyp abtöten. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert
- 20 werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

- Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann be-
- 25 kannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen, einzelnen Zellen (z.B. Protoplasten) oder Blattscheiben aus (Vasil et al. (1984) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II and III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press; Weissbach and Weissbach
- 30 (1989) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press). Aus diesen noch undifferenzierten Kallus-Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Fennell et al. (1992)
- 35 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533).

- Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise in vitro durch Sprossmeristemver-
- 40 mehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression eines Zielgens und die Auswirkung auf den Phänotyp der Pflanze an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

45

## 32

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei

5 pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

Unter Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryotische oder eukaryotische Organismen, wie beispielsweise

10 Mikroorganismen oder pflanzliche Organismen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung Escherichia, Erwinia, Agrobakterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Pseudomonas,

15 Bacillus oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung Synechocystis und weitere in Brock Biology of Microorganisms Eighth Edition auf den Seiten A-8, A-9, A10 und A11 beschriebenen Bakteriengattungen.

20 Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Konstrukte befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung Agrobakterium und insbesondere der Art Agrobakterium tumefaciens. Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind

25 solche, die zur Produktion von Toxinen (z.B. Botulinus Toxin), Pigmenten (z.B. Carotinoiden oder Flavonoiden), Antibiotika (z.B. Penicillin), Phenylpropanoiden (z.B. Tocopherol), Polyungesättigten Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) oder Vitaminen (z.B. Vitamin B12) befähigt sind.

30

Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia.

Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya,

35 Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangs-

40 organismen sind vor allem pflanzliche Organismen.

## 33

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) eines zur Photosynthese befähigten Organismus. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle 5 Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und 10 Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte), Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum 15 Beispiel Zell- oder Kalluskulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungs- 20 stadium.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grün- 25 algen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Insbesondere bevorzugt sind Synechocystis, Chlamydomonas und Scenedesmus.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind insbesondere 30 pflanzliche Organismen bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Blütenpflanzen (Phylum Anthophyta "Angiospermen"). Umfasst sind alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen. Bevorzugt ist die Pflanze aus nachfolgenden Pflanzenfamilien ausgewählt: Amaranthaceae, Asteraceae, 35 Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragoniaceae, Theaceae und Umbelliferae.

40

45

## 34

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel den nachfolgenden

5

- 1) Kategorie: Dicotyledonae (Dicotyledonen). Bevorzugte Familien:

- Aceraceae (Ahornhölzer)

10

- Cactaceae (Kakteen)

- Rosaceae (Rosen, Äpfel, Mandeln, Erdbeeren)

15 - Salicaceae (Weiden)

- Asteraceae (Compositae) besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat), sowie Sonnenblume, Löwenzahn, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

20

- Cruciferae (Brassicaceae), besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea (z.B. Kohl, Blumenkohl oder Broccoli und weitere Kohlarten); und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana

25

sowie Kresse, Rettich, Canola und andere mehr,

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis, Gurken oder Zucchini und andere mehr,

30 - Leguminosae (Fabaceae) besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Lupine oder Erdnuss und andere mehr,

- Malvaceae insbesondere Malve, Baumwolle, essbarer Eibisch,

35 Hibiscus und andere mehr,

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,

40

- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum

45

(Paprika), sowie Tabak, Petunie und andere mehr,

## 35

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakaostrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- Umbelliferae (Apiaceae), besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)), Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Sellerie)) sowie Petersilie und andere mehr;

sowie Lein, Hanf, Flachs, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

Darüberhinaus sind jedoch auch monokotyle Pflanzen geeignet. Bevorzugt sind diese ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel den Familien

- Arecaceae (Palmen)
- Bromeliaceae (Ananas, spanisches Moos)
- Cyperaceae (Seggen)
- Liliaceae (Lilien, Tulpen, Hyazinthen, Zwiebel, Knoblauch)
- Orchidaceae (Orchideen)
- Poaceae (Gräser, Bambusse, Mais, Zuckerrohr, Weizen)
- Iridaceae (Blenden, Gladiolen, Krokusse)

Ganz besonders bevorzugt sind Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie ~~alle Arten~~ von Gräsern.

Im Rahmen der erfindungsgemäßen Expressionskassette kann die Expression einer bestimmten Nukleinsäure durch einen Promotor mit Spezifität für die pflanzliche Blüte zu Bildung von sense-RNA, antisense RNA oder doppelsträngiger RNA in Form einer inversen Wiederholung (dsRNAi) führen. Die sense-RNA kann infolge in bestimmte Polypeptide translatiert werden. Mit der antisense-RNA und dsRNAi kann die Expression bestimmter Gene herunterreguliert werden.

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die



in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen.

Die Spezifität der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte  
5 und Vektoren für pflanzliche Blüten ist besonders vorteilhaft.  
Die Blüte hat eine Funktion im Anlocken von Nutzinsekten durch  
Pigmenteinlagerung oder Synthese flüchtiger Chemikalien.

Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze zum Bei-  
10 spiel gegen Pathogene unzureichend. Die Einführung fremder Gene  
aus Pflanzen, Tieren, oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr  
verstärken. Beispiel sind der Schutz gegen Insektenfrass in  
Tabak durch Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin  
(Vaech et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des  
15 Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus  
der Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197).

Kälteeinbrüche in der Blütezeit führen jedes Jahr zu erheblichen  
Ernteverlusten. Eine gezielte Expression schützender Proteine  
20 gezielt in der Blüteperiode kann einen Schutz gewähren.

Für eine hohe Effizienz solcher gentechnischer Ansätze ist  
eine konzentrierte Expression der entsprechenden transgen zu  
exprimierenden Nukleinsäuresequenz vor allem in den Petalen der  
25 Blüte vorteilhaft. Eine konstitutive Expression in der gesamten  
Pflanze kann den Effekt zum Beispiel durch eine Verdünnung in  
Frage stellen oder das Wachstum der Pflanze bzw. die Qualität des  
Pflanzenproduktes beeinträchtigen. Außerdem kann es durch eine  
konstitutive Expression verstärkt zum Abschalten des Transgens  
30 kommen ("gene silencing").

Hierzu sind Promotoren mit Spezifität für die Blüte vorteilhaft.  
Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Proteinen bekannt, deren  
rekombinante Expression in der Blüte vorteilhaft sind. Ferner  
35 sind dem Fachmann eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren  
Reprimierung oder Ausschaltung mittels Expression einer ent-  
sprechenden antisense-RNA ebenfalls vorteilhafte Effekte erreicht  
werden können. Beispielfhaft jedoch nicht einschränkend für vor-  
teilhafte Effekte seien zu nennen: Das Erzielen einer Resistenz  
40 gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, Trockenheit,  
erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung) und biotische  
Stressfaktoren (Pathogene, Viren, Insekten und Krankheiten),  
die Verbesserung von Nahrungs- oder Futtereigenschaften, die  
Verbesserung der Wachstumsrate oder des Ertrages, das Erzielen  
45 einer längeren oder früheren Blütezeit, die Veränderung oder  
Verstärkung des Duftes oder der Farbgebung der Blüten. Für die  
in diesen Anwendungen einsetzbaren Nukleinsäuresequenzen oder

Polypeptide seien beispielhaft, aber nicht einschränkend, zu nennen:

1. Verbesserter UV-Schutz der pflanzlichen Blüte durch Veränderung der Pigmentierung durch Expression bestimmter Polypeptide wie Enzyme oder Regulatoren der Flavonoidbiosynthese (z.B. Chalconsynthasen, Phenylalaninammoniumlyasen), der DNA-Reparatur (z.B. Photolyasen; Sakamoto A et al. (1998) DNA Seq 9(5-6):335-40), der Isoprenoidbiosynthese (z.B. Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen), der IPP-Synthese oder der Carotinoidbiosynthese (z.B. Phytoensynthasen, Phytoendesaturasen, Lycopincyclasen, Hydroxylasen oder Ketolasen). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Chalconsynthase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: M20308), die 6-4 Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: BAB00748) oder das Blaulicht-Photorezeptor/Photolyase-Homolog (PHH1) aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U62549) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
2. Verbesserter Schutz der pflanzlichen Blüte gegen abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, oder Kälte zum Beispiel durch Überexpression von dem "antifreeze"-Polypeptiden (z.B. aus *Myoxocephalus Scorpius*; WO 00/00512), dem *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsaktivator CBF1, Glutamatdehydrogenasen (WO 97/12983, WO 98/11240), einem späten Embryogenese-gen (LEA) zum Beispiel aus Gerste (WO 97/13843), Calcium-abhängigen Proteinkinasegenen (WO 98/26045), Calcineurinen (WO 99/05902), Farnesyltransferasen (WO 99/06580; Pei ZM et al. (1998) Science 282:287-290), Ferritin (Deak M et al. (1999) Nature Biotechnology 17:192-196), Oxalatoxidase (WO 99/04013; Dunwell JM (1998) Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 15:1-32), DREB1A-Faktor (dehydration response element B 1A; Kasuga M et al. (1999) Nature Biotechnology 17:276-286), Genen der Mannitol- oder Trehalose-synthese (z.B. Trehalosephosphatsynthasen; Trehalosephosphatphosphatasen, WO 97/42326); oder durch Inhibition von Genen wie der Trehalase (WO 97/50561). Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den transkriptionellen Aktivator CBF1 aus *Arabidopsis thaliana* (Gen-Bank Acc.-No.: U77378) oder das "antifreeze"-Protein" aus *Myoxocephalus octodecemspinosus* (GenBank Acc.-No.: AF306348) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
3. Erreichen einer Resistenz zum Beispiel gegen Pilze, Insekten, Nematoden und Krankheiten durch gezielte Absonderung oder Anreicherung bestimmter Metaboliten oder Proteine in der Blüte. Beispielhaft seien genannt Glucosinolate (Nematoden-

abwehr), Chitinasen oder Glucanasen und andere Enzyme, die die Zellwand von Parasiten zerstören, Ribosom-inaktivierende Proteine (RIPs) und andere Proteine der pflanzlichen Resistenz- und Stressreaktion, wie sie bei Verletzung oder mikrobiellen Befall von Pflanzen oder chemisch durch zum Beispiel Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert werden, Lysozyme aus nicht-pflanzlichen Quellen wie zum Beispiel T4 Lysozym oder Lysozym aus verschiedenen Säugern, insektizide Proteine wie *Bacillus thuringiensis* Endotoxin,  $\alpha$ -Amylase-inhibitor oder Proteaseinhibitoren (cowpea Trypsin-inhibitor), Glucanasen, Lektine (z.B. Phytohemagglutinin, Schneeglöckchenlectin, Weizenkeimagglutinin), RNAsen oder Ribozyme. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die chit42 Endochitinase aus *Trichoderma harzianum* (GenBank Acc.-No.: S78423) oder für das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450 (CYP79) aus *Sorghum bicolor* (GenBank Acc.-No.: U32624) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

4. Erreichen einer Insektenabwehr oder -anlockung zum Beispiel durch erhöhte Freisetzung flüchtiger Duft- oder Botenstoffe durch zum Beispiel Enzyme der Terpenbiosynthese.

5. Erreichen einer Speicherfähigkeit in Blütengeweben, die normalerweise keine Speicherproteine oder -lipide enthalten mit dem Ziel, den Ertrag an diesen Substanzen zu erhöhen, z.B. durch Expression einer Acetyl-CoA-Carboxylase oder von Enzymen zur Veresterung von Metaboliten. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Acetyl-CoA Carboxylase (Accase) aus *Medicago sativa* (GenBank Acc.-No.: L25042) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

6. Expression von Transportproteinen, die die Aufnahme von Metaboliten, Nährstoffen oder Wasser in die Blüte verbessern und so das Blütenwachstum, die Metabolitenzusammensetzung oder den Ertrag optimieren, zum Beispiel durch Expression eines Aminosäuretransporters, der die Aufnahme von Aminosäuren beschleunigt, oder eines Monosaccharid-Transporters, der die Aufnahme von Zuckern fördert. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den kationische Aminosäure-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: X92657) oder für den Monosaccharid-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: AJ002399) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

## 39

7. Expression von Genen, die eine Akkumulation von Feinchemikalien, wie von Tocopherolen, Tocotrienolen, Phenylpropanoiden, Isoprenoiden oder Carotinoiden, in der Blüte bewirken. Beispielfhaft seien die Deoxyxylulose-5-phosphat-synthasen, Phytoensynthasen, Lycopin- $\beta$ -cyklasen und die  $\beta$ -Carotinketolasen genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die *Haematococcus pluvialis* NIES-144 (Acc. No. D45881) Ketolase oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
8. Modifikation der Wachsesterbildung oder der Zusammensetzung der eingelagerten Oligosaccharide zur Verbesserung des Schutzes gegen Umwelteinflüsse oder zur Verbesserung der Verdaubarkeit beim Einsatz in Futter- oder Nahrungsmitteln. Beispielfhaft sein die Überexpression der Endoxyloglucantransferase genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Endoxyloglucantransferase (EXGT-A1) aus *Arabidopsis thaliana* (Gen-Bank Acc.-No.: AF163819) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
9. Expression von Genen, DNA Bindeproteinen, dsRNA und antisense Konstruktionen, zur Veränderung der Blütenmorphologie, des Blühzeitpunktes und der Blütenseneszenz sowie des Blütenmetabolismus. Bevorzugt sind Konstruktionen, die die Anzahl der Petalen erhöhen z.B. durch Herunterregulation von AGAMOUS und dessen homologen Genen (Yanofsky MF et al. (1990) Nature 346:35-39) den Blühzeitpunkt verfrühen z.B. durch Herunterregulation von FLOWERING LOCUS C (FLC) (Tadege M et al. (2001) Plant J 28(5):545-53) oder verspäten z.B. durch Überexpression von FLC und die Seneszenz verzögern z.B. durch Vermittlung einer blütenspezifischen Ethyleninsensitivität.
10. Erzeugung von sterilen Pflanzen durch Verhinderung der Befruchtung und/oder der Keimung mit Hilfe der Expression eines geeigneten Inhibitors zum Beispiel eines Toxins in Blüten.
11. Produktion von Nutraceuticals wie zum Beispiel
  - a) Carotinoide und/oder Phenylpropanoide z.B. durch Optimierung der blüteneigenen Stoffwechselwege z.B. durch Expression von Enzymen und Regulatoren der Isoprenoidbiosynthese. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Chalconsynthase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: M20308), die 6-4 Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.No.: BAB00748) oder den Blaulicht-Photorezeptor / Photolyase Homolog (PHH1) aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U62549) oder funktionelle

## 40

- Äquivalente derselben kodieren. Ebenso bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für Enzyme und Regulatoren der Isoprenoidbiosynthese wie die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen und der Carotinoidbiosynthese wie die Phytoensynthasen, Lycopincyclasen und Ketolasen wie von Tocopherolen, Tocotrienolen, Phenylpropanoiden, Isoprenoiden oder Carotiniden, in der Blüte bewirken. Beispielhaft seien die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen, Phytoensynthasen, Lycopincyclasen und die Carotinketolasen genannt. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (Acc. No. D45881) Ketolase oder funktionelle Äquivalente kodieren.
- b) Polyungesättigte Fettsäuren wie beispielsweise Arachidonsäure oder EP (Eicosapentaensäure) oder DHA (Docosahexaensäure) durch Expression von Fettsäureelongasen und/oder -desaturasen oder Produktion von Proteinen mit verbessertem Nahrungswert wie zum Beispiel mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (z.B. das methioninreiche 2S Albumin der Brasilnuss). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für das methioninreiche 2S-Albumin aus *Bertholletia excelsa* (GenBank Acc.-No.: AB044391), die  $\Delta 6$ -Acylipiddesaturase aus *Physcomitrella patens* (GenBank Acc.-No.: AJ222980; Girke et al. (1998) Plant J 15:39-48), die  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Sakura-dani et al 1999 Gene 238:445-453), die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. (1998) FEBS Letters 439:215-218), die  $\Delta 5$ -Fettsäuredesaturase (des-5) aus *Caenorhabditis elegans* (GenBank Acc.-No.: AF078796), die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Michaelson et al. J Biol Chem. 273:19055-19059), die  $\Delta 6$ -Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al. (2000) Proc Natl. Acad. Sci. 97:6421-6426), die  $\Delta 6$ -Elongase aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. (2000,) Biochemical Society Transactions 28:654-657) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
12. Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern, Vakzinen, Hormonen und/oder Antibiotika wie z.B. beschrieben bei Hood EE & Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK & Vine ND (1999) CurrTop Microbiol Immunol 236:275-92.

## 41

Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM (2000) Transgenic approaches to crop improvement. J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte,
- 10 zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

- Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen, wobei
- 15 ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder deren Biosynthese katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte
- 20 Feinchemikalie aus dem Zuchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie
- 25 Carotinoiden wie beispielsweise Astaxanthin. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Zuchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei
- 30 Hood EE & Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10 (4)382-6; Ma JK & Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenzen (bevorzugt
- 35 der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8) zur Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase.

- Bei einer verminderten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit
- 40 durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin vermindert.

- "Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einer  $\epsilon$ -Cyclase, bzw. sei Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität
- 45 weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer

$\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen.

Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine  
5 mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Dabei wird eine bestimmte  $\epsilon$ -Cyclases (bzw. die zugehörige Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder  
10 Aktivität) in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 % vermindert. Insbesondere meint Verminderung auch das vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (bzw. seiner Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität).

15 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität der  $\epsilon$ -Cyclase umfasst. Der Fachmann erkennt, dass eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung stehen, um die Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder  
20 Aktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase in gewünschter Weise zu beeinflussen. Beispielhaft kann die Verminderung durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäuresequenz, die eine zumindest teilweise Homologie zu den erfindungsgemäßen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorsequenzen aufweist ( $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-dsRNA), realisiert  
25 werden. Alternativ können auch die dsRNA-Expression gewährleistende Expressionskassetten angebracht werden.

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist viel-  
30 fach für tierische und pflanzliche Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird  
35 hiermit ausdrücklich Bezug genommen. dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hoch-effiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechen-  
40 den knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

„Doppelsträngiges RNA-Molekül“ meint im Rahmen der Erfindung bevorzugt eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund  
45 komplementärer Sequenzen theoretisch (z.B. gemäß den Basenpaarregeln von Waston und Crick) und/oder faktisch (z.B. aufgrund von Hybridisierungsexperimenten in vitro und/oder in vivo) in der

## 43.

Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden. Dem Fachmann ist bewusst, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei
- 10 Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken. Das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt
- 15 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und
- 20 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.
- 25 Bevorzugt meint ist der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase durch eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrieben.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie (nach weiter unten folgender Definition) mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 %

30 zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für einen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor (bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nukleinsäuresequenz kodierend für einen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor). Dem Fachmann ist dabei bewusst, dass

40 bei einem Homologievergleich zwischen RNA und DNA die Basen Uracil und Thymin als äquivalent zu werten sind.

Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht

45 der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Poly-



morphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können.

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil einer  $\epsilon$ -Cyclase Gen- oder Promotorsequenz zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

"Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor" meint Fragmente einer für einen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt den Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder funktionellen äquivalenten derselben. Dabei haben die Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen.

Die Verwendung der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotorregion zur Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität ist insbesondere vorteilhaft, da hier nur geringe Homologien zu anderen Genen vorliegen und so eine hohe Spezifität der Verminderung ohne Auswirkung auf die Expression anderer Gene erreicht werden kann.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden. Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang

## 45

bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein weiterer Gegenstand der Erfindung Ribonukleinsäuremoleküle umfassend

- a) mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und
  - b) mindestens eine weitere Ribonukleotidsequenz, die zu mindestens einem Teil der Ribonukleotidsequenz unter a) im wesentlichen komplementären ist,
- wobei a) und b) kovalent miteinander verbunden sind und zwischen a) und b) gegebenenfalls weitere Funktionselemente lokalisiert sein können.
- Bevorzugt meint ist der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase durch eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 beschrieben.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt kann ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990). Mol Gen Genet 220(2):245-250).

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

## 46

- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

5

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

- Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-dsRNA auf dem Expressionsvektor enthalten. Entsprechende Expressionsvektoren sind erfindungsgemäß umfasst.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors. Bevorzugt ist der in diesem Zusammenhang eingesetzte Promotor nicht der  $\epsilon$ -Cyclase Promotor, von dem die dsRNA abgeleitet wurde. Es kann sich aber sehr wohl um einen  $\epsilon$ -Cyclase Promotor einer anderen Art handeln. So könnte beispielsweise der  $\epsilon$ -Cyclase Promotor aus Sonnenblume dazu verwendet werden, die dsRNA abgeleitet von dem  $\epsilon$ -Cyclase Promotor aus *Tagetes erecta* zu exprimieren. Bevorzugt steht die Expression der dsRNA abgeleitet von einem  $\epsilon$ -Cyclase Promotor jedoch unter Kontrolle eines Promotors der kein  $\epsilon$ -Cyclase Promotor ist, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des CHRC-Promotors aus *Cucumis sativus* (SEQ ID NO: 81) oder des AP3P-Promotors (SEQ ID NO: 77) oder eines funktionell äquivalenten Teils derselben

- Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase -dsRNA oder für den selbst-komplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

- Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

## 47

Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden, wobei die mRNA-Menge und/oder Aktivität mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase vermindert wird durch Einbringen mindestens einer der erfindungsgemäßen doppelsträngigen RNA-  
5 Sequenzen oder Ribonukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten.

Ketocarotinoide meint Carotinoide, die mindestens eine Keto-  
10 Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

15

20

25

30

35

40

45

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 5
2. SEQ ID NO: 2 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 10
3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor einschließlich 5'-untranslatierter Region und Region kodierend für das Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 15
4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für das mutmaßliche Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 20
5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* flankiert von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung
- 25
6. SEQ ID NO: 6 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor einschließlich 5'-untranslatierter Region und Region kodierend für das Transitpeptid der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* flankiert von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung
- 30
7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana*
- 35
8. SEQ ID NO: 8 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase einschließlich 5'-untranslatierter Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa*
- 40
9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 45

## 49

10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
- 5 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*
12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für die  
 $\epsilon$ -Cyclase *Tagetes erecta*
- 10 13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana*
14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana*
- 15 15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase aus Reis
16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
20  $\epsilon$ -Cyclase aus Reis
- 17.-22 SEQ ID NO: 17 bis 22: Sequenzmotive für  $\epsilon$ -Cyclase Proteine
23. SEQ ID NO: 23 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
25  $\epsilon$ -Cyclase (homologe Sequenz H1) aus *Lactuca sativa*
24. SEQ ID NO: 24 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
30  $\epsilon$ -Cyclase (homologe Sequenz H1) aus *Lactuca sativa*
25. SEQ ID NO: 25 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
35  $\epsilon$ -Cyclase (homologe Sequenz H2) aus *Adonis palaestina*
26. SEQ ID NO: 26 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase (homologe Sequenz H2) aus *Adonis palaestina*
- 40 27. SEQ ID NO: 27 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
 $\epsilon$ -Cyclase (homologe Sequenz H3) aus *Adonis palaestina*
28. SEQ ID NO: 28 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
45  $\epsilon$ -Cyclase (homologe Sequenz H3) aus *Adonis palaestina*

## 50

29. SEQ ID NO: 29 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H4) aus  
Arabidopsis thaliana
- 5 30. SEQ ID NO: 30 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H4) aus  
Arabidopsis thaliana
- 10 31. SEQ ID NO: 31 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H5) aus Citrus X  
paradisi
- 15 32. SEQ ID NO: 32 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H5) aus Citrus X  
paradisi
- 20 33. SEQ ID NO: 33 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H6) aus Citrus X  
paradisi
34. SEQ ID NO: 34 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H6) aus Citrus X  
paradisi
- 25 35. SEQ ID NO: 35 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H7) aus Citrus  
sinensis
- 30 36. SEQ ID NO: 36 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H7) aus Citrus  
sinensis
- 35 37. SEQ ID NO: 37 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H8) aus Spinacea  
oleracea
- 40 38. SEQ ID NO: 38 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H8) aus Spinacea  
oleracea
- 45 39. SEQ ID NO: 39 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H9) aus Solanum  
tuberosum

## 51

40. SEQ ID NO: 40 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H9) aus *Solanum  
tuberosum*
- 5 41. SEQ ID NO: 41 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H10) aus *Daucus  
carota*
- 10 42. SEQ ID NO: 42 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H10) aus *Daucus  
carota*
- 15 43. SEQ ID NO: 43 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H11) aus *Daucus  
carota*
- 20 44. SEQ ID NO: 44 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H11) aus *Daucus  
carota*
- 25 45. SEQ ID NO: 45 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H12) aus *Tomate*
46. SEQ ID NO: 46 Aminosäuresequenz kodierend für eine  
ε-Cyclase (homologe Sequenz H12) aus *Tomate*
47. SEQ ID NO: 47 Nukleinsäuresequenz kodierend für ε-Cyclase-  
spezifische Sonde (gecycl; 510 bp)
- 30 48. SEQ ID NO: 48 Oligonukleotidprimer PR16  
5'-ggcagcaggcaaagcaaagg-3'
49. SEQ ID NO: 49 Oligonukleotidprimer PR22  
5'-cgataagtgcgacattcaagc-3'
- 35 50. SEQ ID NO: 50 Nukleinsäuresequenz umfassend Teil des  
Promotors der ε-Cyclase aus *Tagetes erecta*  
erhalten mittels iPCR
- 40 51. SEQ ID NO: 51 Nukleinsäuresequenz umfassend Teil des  
Promotors der ε-Cyclase aus *Tagetes erecta*  
erhalten mittels TAIL-PCR
- 45 52. SEQ ID NO: 52 Oligonukleotidprimer PR50  
5'-cgccttgatatctgttggattgg-3'



## 52

53. SEQ ID NO: 53 Oligonukleotidprimer PR51  
5'-ctaacaatcaatgagtatgagagc-3'
54. SEQ ID NO: 54 Oligonukleotidprimer PR60  
5'-agagcaaggccagcaggaccacaacc-3'
55. SEQ ID NO: 55 Oligonukleotidprimer PR61  
5'-ccttgggagcttttgggataggctag-3'
56. SEQ ID NO: 56 Oligonukleotidprimer PR63  
5'-tcacgccttgtatctgtttggattgg-3'
57. SEQ ID NO: 57 Oligonukleotidprimer aus dem Satz der AD1  
Primer, wie er in dem Amplifikat wieder  
gefunden wurde 5'-gtcgagtatggagtt-3'
58. SEQ ID NO: 58 Nukleinsäuresequenz kodierend iPCR-Fragment  
(734 bp) aus pTA-ecycP
59. SEQ ID NO: 59 Oligonukleotidprimer OL1  
5'-ctcgagagtaaaatcgtagttatg-3'
60. SEQ ID NO: 60 Oligonukleotidprimer OL2  
5'-ccatggccattgattgtagtaattgattc-3'
61. SEQ ID NO: 61 Oligonukleotidprimer OL3  
5'-ccatggtaatttgcttcgtgtatctgatg-3'
62. SEQ ID NO: 62 Oligonukleotidprimer OL4  
5'-ccatggcgctagcagcgacagtaatg-3'
63. SEQ ID NO: 63 Oligonukleotidprimer OL5  
5'-gatatccggtgtgaggggaactag-3'
64. SEQ ID NO: 64 Oligonukleotidprimer PR1  
5'-gcaagctcgacagctacaaacc-3'
65. SEQ ID NO: 65 Oligonukleotidprimer PR2  
5'-gaagcatgcagctagcagcgacag-3'
66. SEQ ID NO: 66 Nukleinsäuresequenz kodierend für  
Ketolase-35S-Terminator Konstrukt
67. SEQ ID NO: 67 Oligonukleotidprimer PR7  
5'-gagctcactc actgatttcc attgcttg-3'

## 53

68. SEQ ID NO: 68 Oligonukleotidprimer PR8  
5'-cgccgttaagtcgatgtccggttgatttaaacagtgtc-3'
- 5 69. SEQ ID NO: 69 Oligonukleotidprimer PR9  
5'-atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac-3'
70. SEQ ID NO: 70 Oligonukleotidprimer PR10  
5'-taagcttttt gttgaagaga tttgg-3'
- 10 71. SEQ ID NO: 71 Oligonukleotidprimer PR40  
5'-gtcgactacg taagtttctg cttctacc-3'
72. SEQ ID NO: 72 Oligonukleotidprimer PR41  
5'-ggatccggtg atacctgcac atcaac-3'
- 15 73. SEQ ID NO: 73 Oligonukleotidprimer PR124  
5'-aagcttaccg atagtaaaat cgtagtt-3'
74. SEQ ID NO: 74 Oligonukleotidprimer PR125  
20 5'-ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t-3'
75. SEQ ID NO: 75 Oligonukleotidprimer PR126  
5'-gtcgacaaca acaacaaca acctttgc-3'
- 25 76. SEQ ID NO: 76 Oligonukleotidprimer PR127  
5'-ggatccaaca acaacaaca acctttgc-3'
77. SEQ ID NO: 77 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine  
30 modifizierte Version (AP3P) des blüten-  
spezifischen Promoters AP3 aus Arabidopsis  
thaliana
78. SEQ ID NO: 78 Nukleinsäuresequenz kodierend für PIV2  
35 Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel.
79. SEQ ID NO: 79 Nukleinsäuresequenz kodierend für den sense-  
Strang der gegen den  $\epsilon$ -Cyclase Promotor  
gerichteten dsRNA.
- 40 80. SEQ ID NO: 80 Nukleinsäuresequenz kodierend für den  
antisense-Strang der gegen den  $\epsilon$ -Cyclase  
Promotor gerichteten dsRNA.

## 54

81. SEQ ID NO: 81 Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotor des Chromoplasten-spezifischen Carotenoid-assoziierten Proteins (CHRC) aus *Cucumis sativus*
- 5 82. SEQ ID NO: 82 Oligonukleotidprimer PRCHRC5  
5'-gagctctaca aattagggtt ac-3'
83. SEQ ID NO: 83 Oligonukleotidprimer PRCHRC3  
10 5'-aagcttatta ttccaaatt ccg-3'

## Abbildungen

Die in nachfolgenden Abbildungen verwendeten allgemeinen  
15 Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

- |    |   |
|----|---|
|    | GUSI-Intron-GUSII: Reportergen (bakterielle $\beta$ -Glucuronidase) |
|    | Intron: Intron  |
|    | NosT: Terminatorsequenz der Nopalinsynthase (NOS)                   |
| 20 | RB/LB: Rechte bzw. linke T-DNA Begrenzung                           |
|    | 35-T: 35S CaMV Terminator   |
|    | NptII: Kanamycin Resistenz  |
|    | NosP: Promotorsequenz der Nopalinsynthase (NOS)                     |
|    | aadA: bakterielle Spectinomycin Resistenz                           |
| 25 | colE1: Replikationsursprung   |

1. Fig. 1: Analyse der Ecyclase-Transkriptlevel Gesamt-RNA isoliert aus Blättern (L) und Blütenstadien (1-7) von *Tagetes erecta* mittels RNA-Gel-Blot Analyse
- 30 2. Fig. 2: Schematische Darstellung des Vektors pEcycP1:GUS zur blütenspezifischen Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens (GUS) unter Kontrolle des *Tagetes erecta* ecycP1-Regulationselements (Promoter und 5'Untranslatierte Region)

- 35 ecycP1: Promotor der e-Cyclase aus *Tagetes erecta* einschließlich 5'-untranslatierter Region (SEQ ID NO: 2)

- 40 3. Fig. 3: Schematische Darstellung des Vektors pEcycP2:GUS zur blütenspezifischen Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Reportergens (GUS) unter Kontrolle des *Tagetes erecta* ecycP2-Regulationselements (Promoter und 5'Untranslatierte Region und Transitpeptid)

## 55

ecycP2: Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* einschließlich 5'-untranslatierter Region und Transitpeptid (SEQ ID NO: 3)

- 5 4. Fig.4: Schematische Darstellung des Vektors pEcycP2:KETO zur blütenspezifischen Expression der *Haematococcus pluvialis* Ketolase (KETO; SEQ ID NO: 66) unter Kontrolle des *Tagetes erecta* ecycP2-Regulationselements (Promoter und 5'-untranslatierte Region und Transitpeptid; SEQ ID NO: 3).
- 10 5. Fig.5: Schematische Darstellung des Vektors pS5AI7 zur blütenspezifischen Expression von  $\epsilon$ -Cyclase-Promoter spezifischer dsRNA unter Kontrolle des AP3P Promoterfragments zur blütenspezifischen Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel.
- 15 AP3P: modifizierter AP3P Promoter (777 bp),  
P-sense: 358 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase in sense Orientierung,  
intron: IV2 Intron des Kartoffel-Gens ST-LS1
- 20 P-anti: das 361 bp Promoterfragment  $\epsilon$ -Cyclase in antisense Orientierung.
6. Fig.6: Schematische Darstellung des Vektors pS5CI7 zur blütenspezifischen Expression von  $\epsilon$ -Cyclase-Promoter spezifischer dsRNA unter Kontrolle des CHRC Promoterfragments zur blütenspezifischen Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel
- 25 CHRC: CHRC-Promoter (1537 bp),  
P-sense: 358 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase in sense Orientierung,
- 30 Intron: IV2 Intron des Kartoffel-Gens ST-LS1  
P-anti: das 361 bp Promoterfragment  $\epsilon$ -Cyclase in antisense Orientierung.
- 35 7. Fig.7: iPCR Amplifikat, das das 312 bp Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase Promotors enthält
8. Fig.8: TAIL PCR Amplifikat, das das 199 bp Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase Promotors enthält
- 40 9. Fig.9: Nukleotidsequenzvergleich zwischen der publizierten Sequenz der *Haematococcus pluvialis* Ketolase (GenBank Acc.-No.: X86782) und der im Rahmen der Erfindung bereitgestellten Sequenz (vgl. Beispiel 3).
- 45

## 56

10. Fig.10: Proteinsequenzvergleich zwischen der publizierten Sequenz der Haematococcus pluvialis Ketolase (GenBank Acc.-No.: X86782) und der im Rahmen der Erfindung bereitgestellten Sequenz (vgl. Beispiel 3).
- 5
11. Fig.11: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von  $\epsilon$ -Cyclase dsRNAs.
- 10
- AP3P: modifizierter AP3P Promoter (777 bp),  
 rbcS: rbcS Transitpeptid aus Erbse (206 bp),  
 intron: PIV2 Intron des ST-LS1 Gens (SEQ ID NO: 78)  
 term: 35S Polyadenylierungssignal von CaMV (762 bp).
12. Fig.12A-C: Sequenzvergleich verschiedener pflanzlicher  $\epsilon$ -Cyclasen.
- 15
- A: GenBank Acc.-No.: AF152246 (524) Citrus x pardisi "lycopene cyclase"  
 B: GenBank Acc.-No.: AF212130 (165) Daucus carota partial ecyclase sequence  
 20 C: GenBank Acc.-No.: AF229684 (201) Daucus carota partial ecyclase sequence  
 D: GenBank Acc.-No.: AF251016 (516) Tagetes erecta ecyclase  
 E: GenBank Acc.-No.: AF321535 (529) Adonis palaestina ecyclase  
 25 F: GenBank Acc.-No.: AF321536 (529) Adonis palaestina ecyclase  
 G: GenBank Acc.-No.: AF321537 (382) Solanum tuberosum partial ecyclase sequence  
 H: GenBank Acc.-No.: AF321538 (533) Lactuca sativa ecyclase  
 30 I: GenBank Acc.-No.: AF450280 (262) Citrus sinensis ecyclase  
 J: GenBank Acc.-No.: AF463497 (517) Spinacea oleracea ecyclase  
 K: GenBank Acc.-No.: AF486650 (437) Citrus x pardisi ecyclase  
 35 L: GenBank Acc.-No.: AP003332 (540) Reis ecyclase  
 M: GenBank Acc.-No.: AY099485 (525) Tagetes erecta ecyclase  
 N: GenBank Acc.-No.: L40176 (501) Arabidopsis "lycopene cyclase"  
 O: GenBank Acc.-No.: NM125085 (524) Arabidopsis ecyclase  
 40 P: GenBank Acc.-No.: O65837 ecyclase (526) Tomate
13. Fig.13: Schematische Darstellung der inverse PCR ("iPCR")  
 Für die "iPCR" wird genomische DNA eines Zielorganismus mit der zu isolierenden Promotorsequenz mit einem gegebenen  
 45 Restriktionsenzym komplett verdaut und anschließend werden in einem verdünnten Ansatz die einzelnen Fragmente rückligiert, also mit sich selbst zu einem ringförmigen Molekül verbunden.

## 57

In der Vielzahl entstehender ringförmiger DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die die bekannte Sequenz (d.h. die Sequenz kodierend für ein homologes Protein) enthalten. Ausgehend davon kann das ringförmige Molekül mittels PCR  
5 amplifiziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem beide Primer sich an den bekannten Sequenzabschnitt anlagern können. Abkürzungen: P - Promotorsequenz; CR - kodierende Region; L - Ligationsstelle; PCR - Polymerasekettenreaktion. Pfeile geben die Bindestelle potentieller  
10 Oligonukleotidprimer im Bereich der kodierenden Region wieder.

## Beispiele

## 15 Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet & Voet (1995), 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) er-  
20 folgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht  
25 von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der  
30 Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: Analyse von  $\epsilon$ -Cyclase RNA-Transkriptspiegeln während der Blütenentwicklung von *Tagetes erecta*

35

Für die Präparation von Total-RNA aus Blättern und Blüten von *Tagetes erecta* wird Pflanzengewebe geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend werden 100 mg des gefrorenen, pulverisierten Pflanzengewebes in ein  
40 Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol<sup>®</sup>-Puffer (Life Technologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wird der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert.  
45 Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat

(DEPC) bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt.

Die relative Menge an  $\epsilon$ -Cyclase Transkript in Tagetes Blättern und  
5 Blütenstadien wird mittels RNA Gel Blot wie in Sambrook & Russel  
(2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold  
Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York  
Kapitel 7, Protokoll 6) beschrieben, analysiert: Pro Probe werden  
ca. 10 bis 15  $\mu$ g Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel auf-  
10 getrennt. Die relativen Mengen an Gesamt-RNA können anhand der  
mit Ethidiumbromid angefärbten rRNA Banden abgeschätzt werden  
(Fig. 1A). Zur Abschätzung der  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptmengen wird die  
aufgetrennte RNA mittels eines Kapillarblots auf eine Nylonmem-  
bran übertragen.

15 Zur Herstellung einer radioaktiv markierten  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen  
Sonde wurde das Fragment SEQ ID NO: 47 (gecyc1) mittels Poly-  
merasekettenreaktion (PCR) aus genomischer DNA von Tagetes erecta  
unter Verwendung eines sense-spezifischen Primers (PR16 =  
20 5'-ggcacgaggcaaagcaaagg-3', SEQ ID NO: 48) und eines antisense  
spezifischen Primers (PR22 = 5'-cgataagtgcgacattcaagc-3',  
SEQ ID NO: 49) amplifiziert.

Zur Präparation genomischer DNA aus Tagetes erecta wird Blatt-  
25 material von Tagetes erecta geerntet, in flüssigem Stickstoff  
eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend werden  
100 mg des gefrorenen, pulverisierten Pflanzengewebes in ein  
Reaktionsgefäß überführt, in 0,75 ml Extraktionspuffer auf-  
genommen und für 60 min bei 65°C inkubiert. Der Extraktionspuffer  
30 wird frisch hergestellt aus 25 ml Puffer 1. (0,35 M Sorbitol, 0,1  
M Tris-Base, 5 mM EDTA, pH7.5), 25 ml Puffer 2. (0,2 M Tris-Base,  
0,05 M EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB), 10 ml 5 % N-Lauroylsarcosine-  
sodium) und 0,24 g Natriumbisulfit. Anschließend an die 65°C-  
Inkubation wird die Suspension mit 0,7 ml Chloroform/Isoamyl-  
35 alkohol (24:1) vermischt, dann 5 min bei 10000 g zentrifugiert.  
Die obere wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß über-  
führt und die Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wie beschrie-  
ben wiederholt. Anschließend wird die obere wässrige Phase in  
ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA durch Zugabe von  
40 1 ml Isopropanol und anschließende Zentrifugation für 5 min bei  
10000 g pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 0,5 ml 75 % Ethanol  
gewaschen, dann getrocknet und anschließend in 0,05 ml sterilem  
Wasser durch 5 minütige Inkubation bei 65°C resuspendiert.

## 59

Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation eines  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Fragmentes aus genomischer DNA aus *Tagetes erecta* sind die folgenden:

5 Die PCR zur Amplifikation eines  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Fragmentes erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten sind:

- 1  $\mu$ g genomische DNA aus *Tagetes erecta*
- 0,25 mM dNTPs
- 10 - 0,2  $\mu$ M Primer PR16 (SEQ ID NO: 48)
- 0,2  $\mu$ M Primer PR22 (SEQ ID NO: 49)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 25,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

15

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 51°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend ein Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20

Die PCR-Amplifikation mit PR16 und PR22 resultiert in einem 510 bp-Fragment (SEQ ID NO: 47), das unter stringenten Hybridisierungsbedingungen spezifisch mit der  $\epsilon$ -Cyclase nicht aber mit der Lycopen  $\beta$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* hybridisiert. Das Amplifikationsprodukt wird mit dem NucleonSpin<sup>®</sup> Extract Kit (Machery & Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt und für eine radioaktive Markierungsreaktion mit dem Highprime<sup>®</sup> Kit (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Prähybridisierungs-, Hybridisierungs-, und Waschschriffe werden wie bei

30 Sambrook & Russel (2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York Kapitel 6, Protokoll 10) beschrieben durchgeführt. Der letzte Waschschriffe mit 0,1x SSC / 0,1 % SDS bei 65°C bewirkt eine hohe Stringenz der Hybridisierung, die ausreicht, um  
35 mit der beschriebenen Sonde spezifisch die  $\epsilon$ -Cyclase, nicht aber die Lycopen  $\beta$ -Cyclase, zu detektieren. Die relativen  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel können anhand der Hybridisationssignale, detektiert mithilfe eines Phosphorimagers, abgeschätzt werden. Wie in Fig. 1B ersichtlich liegen unter den gegebenen Versuchs-  
40 bedingungen  $\epsilon$ -Cyclase Transkriptlevel in den Blättern unterhalb der Nachweisgrenze, während die gesamte Blütenentwicklung hindurch hohe Mengen an  $\epsilon$ -Cyclase Transkripten nachweisbar sind.



## 60

Beispiel 2: Klonierung des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des *Tagetes erecta*  $\epsilon$ -Cyclase Promoters kann durch zwei unabhängige Klonierungs-  
5 strategien, Inverse PCR (iPCR; adaptiert Long et al. Proc Natl Acad Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu YG et al. (1995) Plant J 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (wie oben beschrieben) aus der *Tagetes erecta*-Linie Orangenprinz isoliert werden.

10

Für den iPCR-Ansatz werden 2  $\mu$ g genomische DNA in einem 25  $\mu$ l Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300  $\mu$ l verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID NO: 52) und PR51

15 (SEQ ID NO: 53) wird durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der  $\epsilon$ -Cyclase cDNA (Genbank Acc.-NO.: AF251016), ligiert an 312 bp des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der  $\epsilon$ -Cyclase cDNA enthält (siehe Fig.7).

20

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält, erfolgt

25 in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1  $\mu$ l Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M Primer PR50 (SEQ ID NO: 52)
- 30 - 0,2  $\mu$ M Primer PR51 (SEQ ID NO: 53)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

35 Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

40 Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultiert in einem 734 bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält (Fig. 7). Das Amplifikat, wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den  
45 Primern M13 und T7 ergeben für das Amplifikat die Sequenz SEQ ID NO: 50.

## 61

Für den TAIL-PCR Ansatz werden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen genspezifischen Primern („nested primers“) durchgeführt.

5 Die TAIL1-PCR erfolgt in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 100 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,2 mM jedes dNTPs
- 10 - 0,2 µM Primer PR60 (SEQ ID NO: 54)
- 0,2 µM Primermischung AD1
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit sterilem, destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt

15

Die Primermischung AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen

5'-(a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)ggt-3' dar. Der Primer mit  
20 der SEQ ID NO: 57 wurde in dem resultierenden Amplifikat wieder-  
gefunden.

Die PCR-Reaktion TAIL1 werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 25 - 1 Zyklus mit 93°C für 1 Minute und 95°C für 1 Minute,
- 5 Zyklen mit 94°C für 30 Sekunden, 62°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten,
- 1 Zyklus mit 94°C für 30 Sekunden, 25°C für 3 Minuten, dann ein Temperaturanstieg auf 72°C innerhalb von 3 Minuten,
- 30 72°C für 2,5 Minuten
- 15 Zyklen mit 94°C für 10 Sekunden, 68°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 68°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 29°C für 1 Minute und 72°C für 2,5 Minuten;
- 35 - 1 Zyklus mit 72° für 5 Minuten.

Die TAIL2-PCR erfolgt in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 40 - 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 0,2 µM Primer PR61 (SEQ ID NO: 55)
- 0,2 µM Primer AD1 (SEQ ID NO: 57)
- 45 - 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit sterilem, destilliertem Wasser auf 21 µl aufgefüllt

## 62

Die PCR-Reaktion TAIL2 wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12 Zyklen mit 94°C für 10 Sekunden, 64°C für 1 Minute, 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 64°C für 1 Minute, 72°C für 2,5 Minuten; 94°C für 10 Sekunden, 29°C für 1 Minute, 72°C für 2,5 Minuten;
- 1 Zyklus mit 72°C für 5 Minuten.

Die TAIL3-PCR erfolgt in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem  
10 enthalten ist:

- 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 15 - 0,2 µM Primer PR63 (SEQ ID NO: 56)
- 0,2 µM Primer AD1 (SEQ ID NO: 57)
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 U R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit sterilem, destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt

20

Die PCR-Reaktion TAIL3 wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 20 Zyklen mit 94°C für 15 Sekunden, 29°C für 30 Sekunden, 72°C für 2 Minuten;
- 25 - 1 Zyklus mit 72°C für 5 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultiert in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment  
30 der  $\epsilon$ -Cyclase enthält (Fig. 8).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergeben die Sequenz  
35 SEQ ID NO: 51. Diese Sequenz ist im Überlappungsbereich identisch mit der Sequenz SEQ ID NO: 50, die mit der iPCR Strategie isoliert wird, und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten Tagetes erecta Linie Orangenprinz.

40 Der pCR2.1-Klon, der das 734 bp-Fragment (SEQ ID NO: 58), das durch die iPCR-Strategie isoliert wird, enthält, heißt pTA-ecycP und wird für die Herstellung der Expressionskonstrukte verwendet.

## 63

### Beispiel 3: Herstellung von transgenen $\epsilon$ -Cyclase-Expressionskassetten und Expressionsvektoren

Das  $\epsilon$ -Cyclase-Regulationselement ecycP1, enthaltend ein Promoter-  
 5 fragment und die 5'-nicht-translatierte Region der  $\epsilon$ -Cyclase aus  
*Tagetes erecta*, wird verwendet, um die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson  
 et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) in Tomatenblüten (*Lycopersicon*  
*esculentum*) zu exprimieren. Weiterhin wird das  $\epsilon$ -Cyclase-Regu-  
 lationselement ecycP2, enthaltend ein Promoterfragment, die  
 10 5'-nichttranslatierte Region sowie das mutmaßliche Transitpeptid  
 der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta*, verwendet, zur Expression ent-  
 weder der  $\beta$ -Glucuronidase oder der *Haematococcus pluvialis* Keto-  
 lase in Plastiden von Tomatenblüten.

15 Die Herstellung der transgenen Expressionsvektoren pEcycP1:GUS,  
 pEcycP2:GUS, pEcycP2:KETO für die Agrobakterium vermittelte  
 Transformation in *Lycopersicon esculentum* erfolgte unter Ver-  
 wendung des binären Vektors pS0301 (WO 02/00900). Zur Her-  
 stellung der Transformationsplasmide werden die Fragmente ecycP1  
 20 und ecycP2 mittels PCR unter Verwendung des Klones pTA-ecycP  
 sowie der Primer OL1 (SEQ ID NO: 59) und OL2 (SEQ ID NO: 60)  
 (für ecycP1) bzw. der Primer OL1 (SEQ ID NO: 59) und OL3  
 (SEQ ID NO: 61) (für ecycP2) hergestellt.

25 Die PCR zur Amplifikation eines  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Fragmentes  
 erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 50 ng pTA-ecycP Plasmid
- 0,25 mM dNTPs
- 30 - 0,2  $\mu$ M Primer OL1 (SEQ ID NO: 59)
- 0,2  $\mu$ M Primer OL2 (SEQ ID NO: 60) für ecycP1 bzw.  
 Primer OL3 (SEQ ID NO: 61) für ecycP2
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 35 - 25,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten, 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute,  
 50°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten, abschließend 1 Zyklus  
 40 mit 72°C für 10 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit OL1 und OL2 resultiert in einem  
 456 bp-Fragment (ecycP1, SEQ ID NO: 5), die PCR-Amplifikation  
 mit OL1 und OL3 resultiert in einem 543 bp-Fragment (ecycP2,  
 45 SEQ ID NO: 6). Die Amplifikate ecycP1 bzw. ecycP2 werden unter  
 Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor  
 pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und die Klone pTA-ecycP1 bzw.

pTA-ecycP2 erhalten. Sequenzierungen der beiden Klone bestätigen Sequenzen, die im jeweiligen Überlappungsbereich zu SEQ ID NO: 47 bzw. SEQ ID NO: 58 identisch sind. Diese Klone werden daher für die Ligation in den Transformationsvektor pS0301 (WO 02/00900) 5 verwendet.

Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP1:GUS wird das 454 bp XhoI-NcoI ecycP1 Fragment aus pTA-ecycP1 isoliert und in den XhoI-NcoI geschnittenen Vektor pS0301 ligiert. Der Klon, der 10 das ecycP1-Fragment in der korrekten Orientierung enthält, heißt pEcycP1:GUS (Fig.2, Konstruktkarte).

Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP2:GUS wird das 541 bp XhoI-NcoI ecycP1 Fragment aus pTA-ecycP2 isoliert und in 15 den XhoI-NcoI geschnittenen Vektor pS0301 ligiert. Der Klon, der das ecycP2-Fragment in der korrekten Orientierung enthält, heißt pEcycP2:GUS (Fig.3, Konstruktkarte).

Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP2:KETO wird die 20 Region "GUSI/intron/GUSII/35ST" begrenzt durch eine NcoI- und eine HindIII-Restriktionsschnittstelle in pEcycP2:GUS gegen eine „Ketolase/35S-Terminator“-Region ausgetauscht. Hierzu wird das Plasmid pEcycP2:GUS nach Standardmethoden mit HindIII linearisiert, die dabei entstehenden 5'-Überhänge mit Klenow-Fragment 25 aufgefüllt und abschließend die "GUSI/intron/GUSII/35ST"-Region durch Restriktionsverdau mit NcoI entfernt.

Die „Ketolase/35STerminator“-Region wird hergestellt durch

- 30 1. Klonierung einer Ketolase-cDNA, hergestellt mit aus *Haematococcus pluvialis* (Flotow em. Wille) isolierter RNA, gefolgt von
2. Herstellung einer transkriptionellen Ketolase/Terminator-Fusion durch Ligation der Ketolase-Sequenz in den Vektor
- 35 pJIT117, was dann als Vorlage für
3. die PCR Amplifikation der Ketolase/35S-Terminator Region, dient.

Die cDNA, die für die Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* 40 codiert, wird mittels PCR aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80 der "Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen") Suspensionskultur amplifiziert.

Für die Präparation von Total-RNA aus einer Suspensionskultur 45 von *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80), die 2 Wochen mit indirektem Tageslicht bei Raumtemperatur in *Haematococcus*-Medium (1,2 g/l Natriumacetat, 2 g/l Hefeextrakt, 0,2 g/l MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O,

## 65

0,02 CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; pH 6,8; nach Autoklavieren Zugabe von 400 mg/l L-Asparagin, 10 mg/l FeSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) angezogen wird, werden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser pulverisiert. Anschließend werden 100 mg der gefrorenen, pulverisierten Algenzellen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol®-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wird mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wird der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wird mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wird photometrisch bestimmt.

Für die cDNA-Synthese werden 2,5 µg Gesamt-RNA für 10 min. bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads®, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR1 SEQ ID NO: 64) in cDNA umgeschrieben.

Die Nukleinsäure kodierend eine Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* (Stamm 192.80) wird mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus *Haematococcus pluvialis* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR2; SEQ ID NO: 65) und eines antisense spezifischen Primers (PR1; SEQ ID NO: 64) amplifiziert. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der cDNA, die für ein Ketolase Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 4 µl einer *Haematococcus pluvialis* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 35 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR1 (SEQ ID NO: 64)
- 0,2 µM Primer PR2 (SEQ ID NO: 65)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 40 - 25,8 µl steriles, destilliertes Wasser

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten; 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

## 66

Die PCR-Amplifikation mit PR1 und PR2 resultiert in einem 1155 bp-Fragment, das für ein Protein bestehend aus der gesamten Primärsequenz codiert. Unter Verwendung von Standardmethoden wird das Ketolase-Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-Teasy 5 (Promega) kloniert und der Klon pGKETO2 erhalten.

Sequenzierung des Klons pGKETO2 mit dem T7- und dem SP6-Primer bestätigt eine Sequenz, die sich lediglich in den drei Codons 73, 114 und 119 in je einer Base von der publizierten Sequenz (Gen-  
10 bank Acc.No.: X86782) unterscheidet. Diese Nukleotidaustausche werden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz im verwendeten *Haematococcus pluvialis* Stamm 192.80 (Fig. 9 und 10, Sequenzvergleiche). Dieser Klon wird für die Klonierung in den  
15 Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res 16: 11380) verwendet. Die weitere Klonierung erfolgt durch Isolierung des 1031 bp SphI-Fragmentes aus pGKETO2 und Ligierung in den SphI geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der die *Haematococcus pluvialis* Ketolase in der korrekten Orientierung als  
20 N-terminale translationale Fusion mit dem rbcS Transitpeptid enthält, heißt pJKETO2.

Mittels PCR unter Verwendung von pJKETO2 sowie der Primer OL4 (SEQ ID NO: 62) und OL5 (SEQ ID NO: 63) wird die 1795 bp Keto-  
25 lase/35S-Terminator-Region hergestellt. Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des OL4-OL5 DNA-Fragmentes, das die kodierende Region der Ketolase gefolgt vom 35S Terminator aus  
30 caMV enthält, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 µl pJKETO2 (1 ng Plasmid-DNA)
- 0,25 mM dNTPs
- 35 - 0,2 µM Primer OL4 (SEQ ID NO: 62)
- 0,2 µM Primer OL5 (SEQ ID NO: 63)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

40

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

45

Die PCR-Amplifikation mit Primer OL4 und OL5 resultiert in einem 1795 bp-Fragment, das die kodierende Region der Ketolase gefolgt vom 35S-Terminator aus CaMV enthält. Dieses 1795 bp Amplifikat wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und der Klon "pTA-KETO/5 Term" erhalten. Sequenzierungen des Klones bestätigt eine im jeweiligen Überlappungsbereich zu SEQ ID NO: 66 bzw. pJIT117 identische Sequenz. Dieser Klon wird daher für die Ligation in den Transformationsvektor pEcycP2:GUS (s.o.) verwendet. Zur Herstellung des Transformationsplasmids pEcycP2:KETO wird das 1791 bp NcoI-EcoRV "KETO/Term"-Fragment aus pTA-KETO/Term isoliert und in den linearisierten Vektor pEcycP2:GUS, enthaltend ein NcoI-5'Überhang und ein Blunt-End, ligiert. Der Klon, der das ecycP2-Fragment in der korrekten Orientierung enthält, heißt 15 pEcycP2:KETO (Fig. 4, Konstruktkarte).

#### Beispiel 4: Herstellung und Analyse transgener Tomatenpflanzen

Die Konstrukte pEcycP1:GUS, pEcycP2:GUS und pEcycP2:KETO wurden 20 durch Agrobakterium tumefaciens vermittelte Transformation in Tomate transformiert. Als Ausgangsexplantat für die Transformation dienen Kotyledonen und Hypokotyle sieben bis zehn Tage alter Keimlinge der Linie Microtom. Für die Keimung wird das Kulturmedium nach Murashige und Skoog (Murashige & Skoog (1962) 25 Physiol Plant 15,473-497) mit 2 % Saccharose, pH 6,1 verwendet. Die Keimung findet bei 21°C bei wenig Licht (20 bis 100 µE) statt. Nach sieben bis zehn Tagen werden die Kotyledonen quer geteilt und die Hypokotyle in ca. 5 bis 10 mm lange Abschnitte geschnitten und auf das Medium MSBN (MS, pH 6,1, 3 % Saccharose 30 mit 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,1 mg/l Naphthalenacetat (NAA) gelegt, das am Vortag mit suspensionenkultivierten Tomatenzellen beschickt wurde. Die Tomatenzellen werden luftblasenfrei mit sterilem Filterpapier abgedeckt. Die Vorkultur der Explantate auf dem beschriebenen Medium erfolgt für drei bis fünf Tage. 35 Anschließend werden die Explantate mit dem Agrobakterium tumefaciens Stamm LBA4404, der das binäre Plasmid mit dem zu transformierenden Gen trägt, wie folgt infiziert: Der Stamm, der über Nacht in YEB Medium mit dem Antibiotikum für das Binärplasmid bei 28°C kultiviert worden ist wird zentrifugiert. Das Bakterien- 40 pellet wird mit flüssigem MS Medium (3 % Saccharose, pH 6,1) resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,3 (bei 600 nm) eingestellt. Die vorkultivierten Explantate werden in die Suspension überführt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Explantate 45 mit sterilem Filterpapier getrocknet und für die dreitägige Co-Kultur (21°C) auf ihr Vorkulturmedium zurück gelegt.



## 68

Nach der Co-kultur werden die Explantate auf MSZ2 Medium (MS pH 6,1 mit 3 % Saccharose, 2 mg/l Zeatin, 100 mg/l Kanamycin, 160 mg/l Timentin) transferiert und für die selektive Regeneration bei 21°C unter Schwachlicht Bedingungen (20 bis 5 100 µE, Licht/Dunkel-Rhythmus 16h / 8h) aufbewahrt. Alle zwei bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate bis sich Sprosse bilden. Kleine Sprosse können vom Explantat abgetrennt werden und auf MS (pH 6,1 mit 3 % Saccharose) 160 mg/l Timentin, 30 mg/l Kanamycin, 0,1 mg/l IAA bewurzelt werden. Bewurzelte Pflanzen 10 werden ins Gewächshaus überführt.

Die Transgenizität bewurzelter Tomatenpflanzen wird mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA bestätigt. Das Aktivitätsprofil des  $\epsilon$ -Cyclase-Promoterfragments lässt sich im Fall des ecycP:GUS 15 Konstruktes durch GUS-Assay nach Standardmethoden untersuchen (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907). Das Aktivitätsprofil des  $\epsilon$ -Cyclase-Promoterfragment lässt sich im Fall des Konstruktes pEcycP2:KETO durch Northernblot-Analyse nach Standardmethoden unter Verwendung einer Ketolase-spezifischen 20 Hybridisierungssonde oder durch Ketolase-spezifische Realtime-PCR (Sambrook & Russel, 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) untersuchen.

25 Beispiel 5: Herstellung eines transgenen Expressionsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz

Die Expression von invertierten-"Repeat" Transkripten bestehend 30 aus Fragmenten des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors in *Tagetes erecta* erfolgt unter Kontrolle einer modifizierten-Version (AP3P) des blüten-spezifischen Promotors AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-NO.: AL132971: Nukleotidregion 9298 bis 10200; Hill et al. (1998) Development 125:1711-1721). Das invertierte-"Repeat" 35 Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G et al. (1990) Mol Gen Genet 220:245-50) 40 miteinander verbunden sind.

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wird mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) 45 und der Primer PR7 (SEQ ID NO: 67) und PR10 (SEQ ID NO: 70) hergestellt. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

## 69

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 5 - 1 µl (entsprechend 20 ng) genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd.; hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR7 (SEQ ID NO: 67)
- 10 - 0,2 µM Primer PR10 (SEQ ID NO: 70)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

15 Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

- 20 Das 922 bp Amplifikat wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigt eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz GenBank Acc.-No.: AL132971)
- 25 und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz GenBank Acc.-No.: AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (GenBank Acc.-No.: AL132971, Nukleotidregion 9298 bis 10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede können in einem unab-
- 30 hängigen Amplifikationsexperiment reproduziert werden und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

Die modifizierte Version AP3P wird mittels rekombinanter PCR

35 unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200 bis 9771 wird mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 67) und Primern PR9 (SEQ ID NO: 69) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526 bis 9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID NO: 68) und PR10 (SEQ ID NO: 70) amplifiziert (Amplifikat A8/10). Die PCR-

40 Bedingungen sind die folgenden:

## 70

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200 bis 9771 und 9526 bis 9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgt in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten ist:

5

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR7 (SEQ ID NO: 67) bzw. Primer PR8 (SEQ ID NO: 68)
- 10 - 0,2 µM Primer PR9 (SEQ ID NO: 69) bzw. Primer PR10 (SEQ ID NO: 70)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

15

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des

- 25 AP3 Promoters (AP3P) in dem die Positionen 9670 bis 9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgt in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

30

- 0,5 µg A7/9
- 0,25 µg A8/10

Das Auffüllen der 3'-Enden (30 min bei 30°C) erfolgt in einem

- 35 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 40 - 2 µl 1 X Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

- Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wird mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen
- 45 Primers (PR7 SEQ ID NO: 67) und eines antisense spezifischen

## 71

Primers (PR10 SEQ ID NO: 70) amplifiziert. Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgt in einem 5 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 10 - 0,2 µM Primer PR7 (SEQ ID NO: 67)
- 0,2 µM Primer PR10 (SEQ ID NO: 70)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

15

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 50°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

20

Die PCR-Amplifikation mit den Primern PR7 (SEQ ID NO: 67) und PR10 (SEQ ID NO: 70) resultiert in einem 777 bp Fragment, das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert (SEQ ID NO: 77).

Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen)

25 kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz GenBank Acc.-No.: AL132971, Region 10200 bis 9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285 bis 9526 deletiert ist. Dieser Klon wird für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids

30 Res 16:11380) verwendet.

Die Klonierung erfolgt durch Isolierung des 775 bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P

35 anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wird mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT

(Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220:245-250) sowie der

40 Primer PR40 (SEQ ID NO: 71) und PR41 (SEQ ID NO: 72) herstellt.

Die PCR-Bedingungen sind die folgenden:

45

## 72

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgt in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 5 - 50 ng p35SGUS INT
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM Primer PR40 (SEQ ID NO: 71)
- 0,2 µM Primer PR41 (SEQ ID NO: 72)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 10 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl steriles, destilliertes Wasser

Die PCR wird unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:  
 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute,  
 15 53°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultiert in einem 212 bp-Fragment (SEQ ID NO: 78). Unter Verwendung von Standard-  
 20 methoden wird das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigt eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT. Dieser Klon wird für die  
 25 Klonierung in den Vektor pJAP3P (s.o.) eingesetzt. Die Klonierung erfolgt durch Isolierung des 210 bp SalI-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'-Ende des  
 30 rbcS Transitpeptides enthält, heißt pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

Beispiel 6: Herstellung von invertierten-"Repeat"-Expressions-  
 35 kassetten für die blütenspezifische Expression von ε-Cyclase-Promotor dsRNAs in *Tagetes erecta*

Die Expression von invertierten-"Repeat" Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der ε-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte  
 40 unter Kontrolle einer modifizierten Version (AP3P) des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 5) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank Acc.-No. AF099501). Das invertierte-"Repeat" Transkript enthält jeweils ein ε-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung (Sense-  
 45 Fragment) und ein sequenzidentisches ε-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch

## 73

ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 5) mit einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente werden mittels PCR unter Verwendung von  
5 Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 2) und der Primer PR124 (SEQ ID NO: 73) und PR126 (SEQ ID NO: 75) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID NO: 74) und PR127 (SEQ ID NO: 76) hergestellt. Die Bedingungen der PCR-Reaktionen sind die folgenden:

10 Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält, erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 1  $\mu$ l pTA-ecycP (10 ng/ $\mu$ l; siehe Beispiel 2)
- 15 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M Primer PR124 (SEQ ID NO: 73)
- 0,2  $\mu$ M Primer PR126 (SEQ ID NO: 75)
- 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagen)
- 0,25  $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagen)
- 20 - 28,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der  $\epsilon$ -Cyclase enthält, erfolgt in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten ist:

- 25
- 1  $\mu$ l pTA-ecycP (10 ng/ $\mu$ l; siehe Beispiel 2)
  - 0,25 mM dNTPs
  - 0,2  $\mu$ M Primer PR125 (SEQ ID NO: 74)
  - 0,2  $\mu$ M Primer PR127 (SEQ ID NO: 76)
  - 30 - 5  $\mu$ l 10X PCR-Puffer (Stratagen)
  - 0,25  $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagen)
  - 28,8  $\mu$ l steriles, destilliertes Wasser

Die PCR-Reaktionen werden unter folgenden Zyklusbedingungen  
35 durchgeführt: 1 Zyklus mit 94°C für 2 Minuten. 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 53°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute. Abschließend 1 Zyklus mit 72°C für 10 Minuten.

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultiert in  
40 einem 358 bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Frag-  
45 ment, werden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigen jeweils eine

## 74

Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID NO: 58. Diese Klone werden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 5) verwendet.

5

Der erste Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 356 bp PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der das  $\epsilon$ -Cyclase Promoter-

10 fragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt. Der zweite Klonierungsschritt erfolgt durch Isolierung des 359 bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-  
15 BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das  $\epsilon$ -Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase Promoters.

20

Für die Herstellung einer invertierten-"Repeat" Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wird ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5'  
25 (SEQ ID NO 82) und PRCHRC3' (SEQ ID NO: 83) amplifiziert. Das Amplifikat wird in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigen eine zur Sequenz GenBank Acc.-No.: AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wird daher  
30 für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet. Die Klonierung erfolgt durch Isolierung des 1535 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält heißt cs45.

35

Die Herstellung der Transformationsplasmide für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgt unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

40

Zur Herstellung des Transformationsplasmides pS5AI7 wird das 1683 bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Fig. 5, Konstruktkarte).

45

## 75

Zur Herstellung des Transformationsplasmides pS5CI7 wird das 2448 bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Fig.6, Konstruktkarte).

## 5 Beispiel 7: Herstellung und Analyse transgener Tagetespflanzen

Die Transformationsplasmides pS5AI7 und pS5CI7 werden durch Agrobakterium tumefaciens vermittelte Transformation in Tagetes transformiert.

10

Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige & Skoog (1962) Physiol Plant 15:473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C / 20 bis 200 µE / 3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS - Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid, das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt bar oder pat) sowie ein oder mehrere Trait- oder Reportergene tragen kann wird, über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, daß eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL)) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolyllessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem



## 76

Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\mu\text{Mol/m}^2 \times \text{sec}$ , Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar. Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $\text{GA}_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

25

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.

30

- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.

35

- Die Zugabe von  $\text{AgNO}_3$  (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.

40 - Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.

45

## 77

- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

5

Die Transgenizität bewurzelter Sprosse kann anhand isolierter genomischer DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht werden. Die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Transkriptmengen (im Vergleich mit dem zur Transformation verwendeten Wildtyp)

- 10 infolge Transformation mit dem Transformationsplasmid pS5AI7 oder pS5CI7 kann untersucht werden durch Northernblotanalyse nach Standardmethoden (Sambrook & Russel, 2001, Molecular Cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) unter Verwendung einer
- 15  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischen Hybridisierungssonde, beispielsweise wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Weiterhin kann die Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase-Transkriptmengen (im Vergleich mit dem zur Transformation verwendeten Wildtyp) mittels  $\epsilon$ -Cyclase-spezifischer Realtime PCR untersucht werden.

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen  
5 in der pflanzlichen Blüte, wobei nachfolgende Schritte umfasst sind
- I. Einbringen einer transgenen Expressionskassette in  
10 pflanzliche Zellen, wobei die transgene Expressionskassette mindestens nachfolgende Elemente enthält
- a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend  
für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und
- 15 b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,  
wobei mindestens eine der besagten Promotorsequenzen und  
20 eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz oder die pflanzliche Zelle heterolog ist, und
- 25 II. Auswahl von transgenen Zellen, die besagte Expressionskassette stabil in das Genom integriert enthalten, und
- III. Regeneration von vollständigen Pflanzen aus besagten  
transgenen Zellen, wobei mindestens eine der weiteren  
30 Nukleinsäuresequenz in der Blüte exprimiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Promotorsequenz eines  
Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz ausgewählt  
ist aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus
- 35 i) der Promotorsequenz der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* gemäß SEQ ID NO: 7, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa* gemäß  
SEQ ID NO: 8, und
- 40 ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß  
SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß  
SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 und
- 45

iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

5

3. Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine  $\epsilon$ -Cyclase kodieren, wobei bei der Identifikation und/oder Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.

10

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 45 umfasst.

15

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, wobei das Verfahren unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird und die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.

20

6. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte, umfassend nachfolgende Schritte:

25

I. Isolation einer Promotorsequenz, wobei bei der Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 oder 22 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.

30

II. Funktionelle Verknüpfung besagter Promotorsequenz mit einer weiteren Nukleinsäuresequenz, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf den Promotor heterolog ist.

35

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 oder 45 umfasst.

40

45

## 80

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, wobei das Verfahren unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion durchgeführt wird und die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.
- 5
9. Transgene Expressionskassette zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in der pflanzlichen Blüte, umfassend
- 10 a) mindestens eine Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase, und
- b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und
- 15 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die
- 20 Promotorsequenz heterolog ist.
10. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 9, wobei die Promotorsequenz eines Gens kodierend für eine  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz ist ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus
- 25
- i) der Promotorsequenz der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Arabidopsis thaliana* gemäß SEQ ID NO: 7, der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Oryza sativa* gemäß
- 30 SEQ ID NO: 7, und
- ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß
- 35 SEQ ID NO: 1, 7 oder 8 und
- iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie der Promotor der  $\epsilon$ -Cyclasen gemäß
- 40 SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

## 81

11. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 9 oder 10, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz

- 5 a) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, oder
- b) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense-RNA, anti-sense-RNA oder doppelsträngigen RNA

10

ermöglicht.

12. Isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend

15

- a) den Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 oder

- b) ein funktionell äquivalentes Fragment von a) mit im wesentlichen der gleiche Promotoraktivität wie a).

20

13. Isolierte Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 12, umfassend in 3'-Orientierung zu dem Promotor der  $\epsilon$ -Cyclase aus *Tagetes erecta* gemäß SEQ ID NO: 1 oder einem funktionell äquivalenten Fragment der vorgenannten, eine Sequenz kodierend für eine 5'-untranslatierte Region und/oder ein Transidpeptid.

25

14. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 12 oder 13 umfassend eine Sequenz beschrieben durch SEQ ID NO: 2 oder 3.

30 15. Doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und

35

- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen komplementären ist.

40

16. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 15, wobei der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz umfasst ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

45

## 17. Ribonukleinsäuremolekül umfassend

- 5 a) mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für den Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase, und
- 10 b) mindestens eine weitere Ribonukleotidsequenz, die zu mindestens einem Teil der Ribonukleotidsequenz unter a) im wesentlichen komplementären ist,

wobei a) und b) kovalent miteinander verbunden sind und zwischen a) und b) gegebenenfalls weitere Funktionselemente lokalisiert sein können.

15

18. Ribonukleinsäuremolekül nach Anspruch 17, wobei der Promotorbereich der  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz umfasst ausgewählt aus den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 7 oder 8.

## 20 19. Transgene Expressionskassette, umfassend

- a) mindestens einen in Pflanzen funktionellen Promotor, und
- 25 b) mindestens eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 15 oder 16 oder kodierend für ein Ribonukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18,

30 wobei mindestens einer der besagten Promotor und mindestens eine der besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell miteinander verknüpft sind und der Promotor in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz heterolog ist.

- 35 20. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 19, wobei der Promotor ein Promotor mit Spezifität für die pflanzliche Blüte ist.

- 40 21. Transgener Expressionvektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14 oder eine transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20.

- 45 22. Transgener Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, eine doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, eine Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18, eine transgene Expressionskassette gemäß

einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20 oder einen transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 21.

23. Transgener Organismus nach Anspruch 22 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen und pflanzlichen Organismen.
24. Transgener Organismus nach Anspruch 22 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, nicht-menschlichen tierischen und pflanzlichen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut.
25. Transgener Organismus nach Anspruch 23 oder 24 ausgewählt aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.
26. Verwendung einer isolierten Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, einer doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, einer Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18, einer transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20, eines transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 21 oder eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25 oder von diesem abgeleiteter Zellkulturen, Teile, Organe, Gewebe oder transgenes Vermehrungsgut in Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuren oder Proteinen.
27. Verwendung einer isolierten Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, einer doppelsträngige RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, einer Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18, einer transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 9, 10, 11, 19 oder 20, eines transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 21 oder eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25 oder von diesem abgeleiteter Zellkulturen, Teile, Organe, Gewebe oder transgenes Vermehrungsgut zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.
28. Verfahren zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wobei ein transgener Organismen nach einem der Ansprüche 23 bis 25 gezüchtet wird und das gewünschte Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutikum oder Feinchemikalie unter Verwendung des besagten Organismus hergestellt und/oder isoliert wird.



## 84

29. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden, wobei die mRNA-Menge und/oder Aktivität mindestens einer  $\epsilon$ -Cyclase vermindert wird durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen RNA gemäß Anspruch 15 oder 16, einer Ribonukleotidsequenz gemäß Anspruch 17 oder 18 oder einer transgene Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 19 oder 20.

10

15

20

25

30

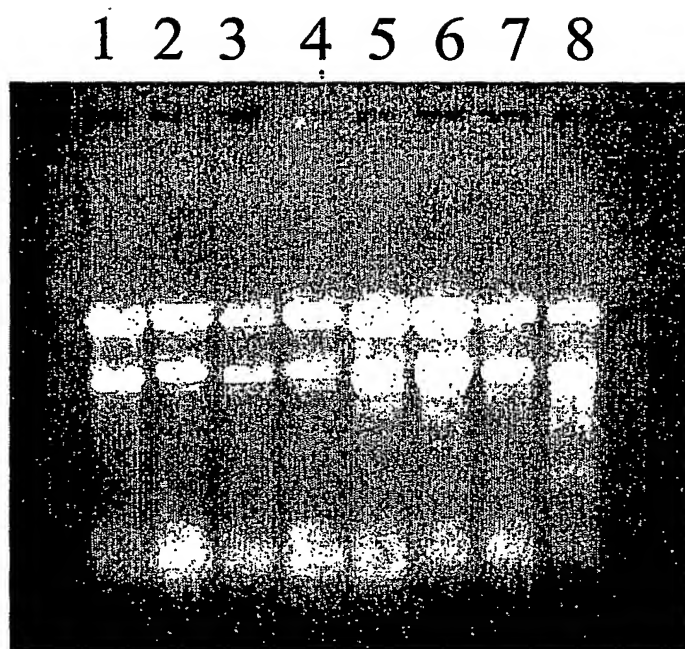
35

40

45

1/15

A



B

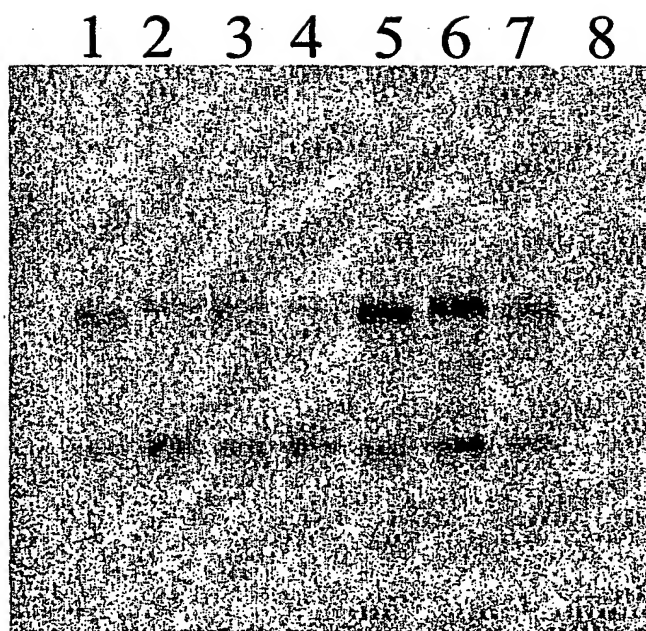


Fig.1

2/15

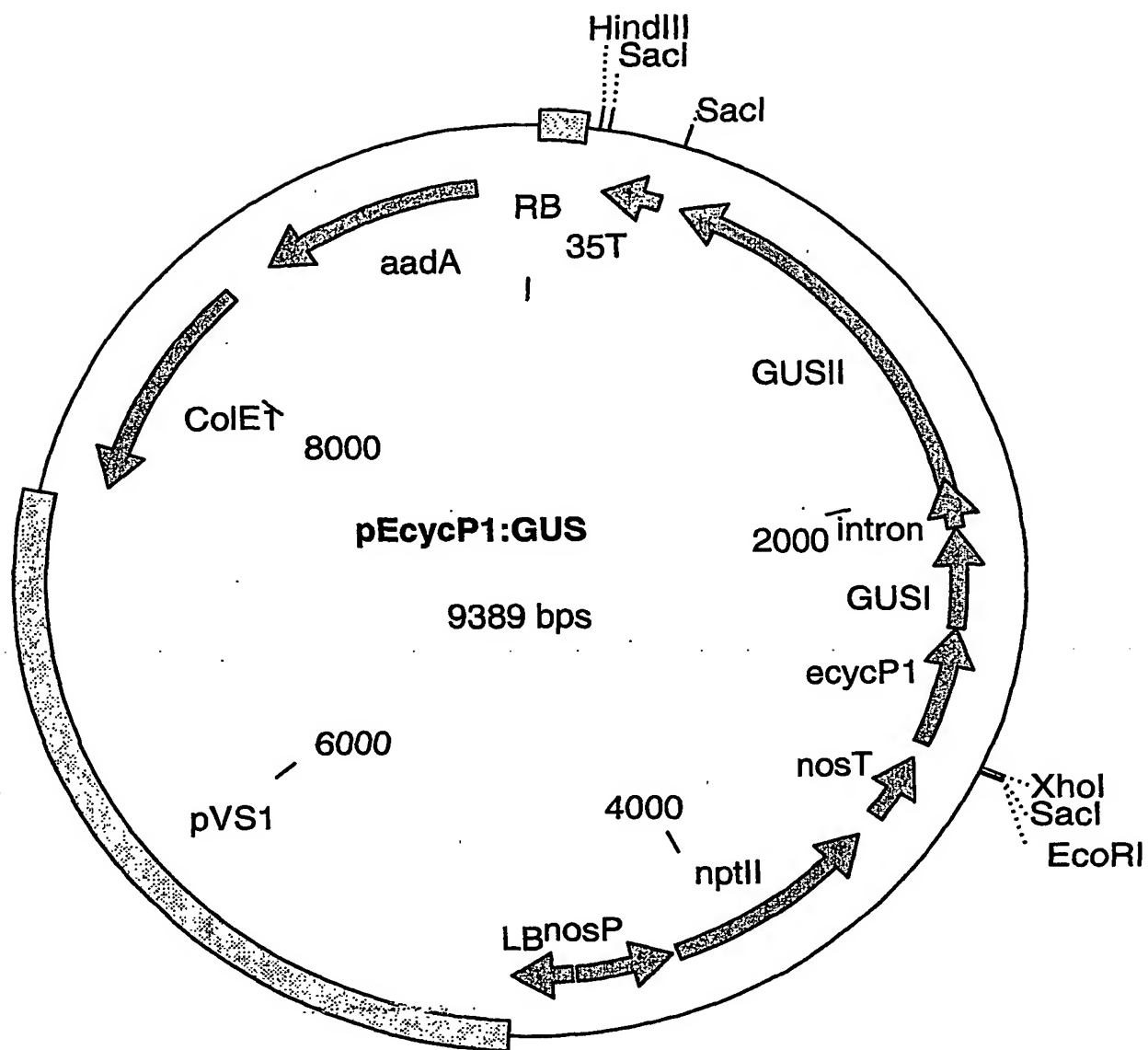


Fig.2

3/15

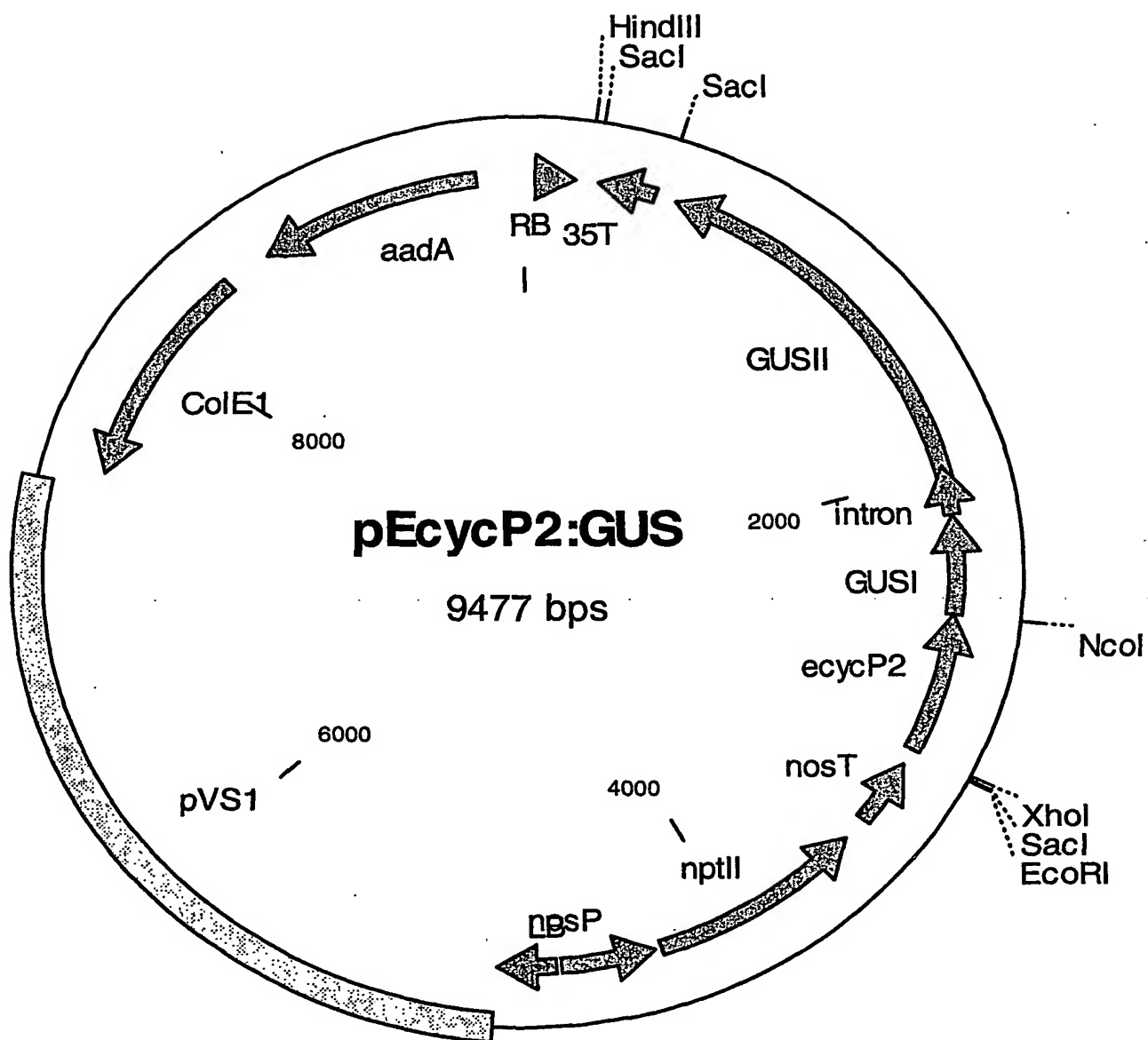


Fig.3

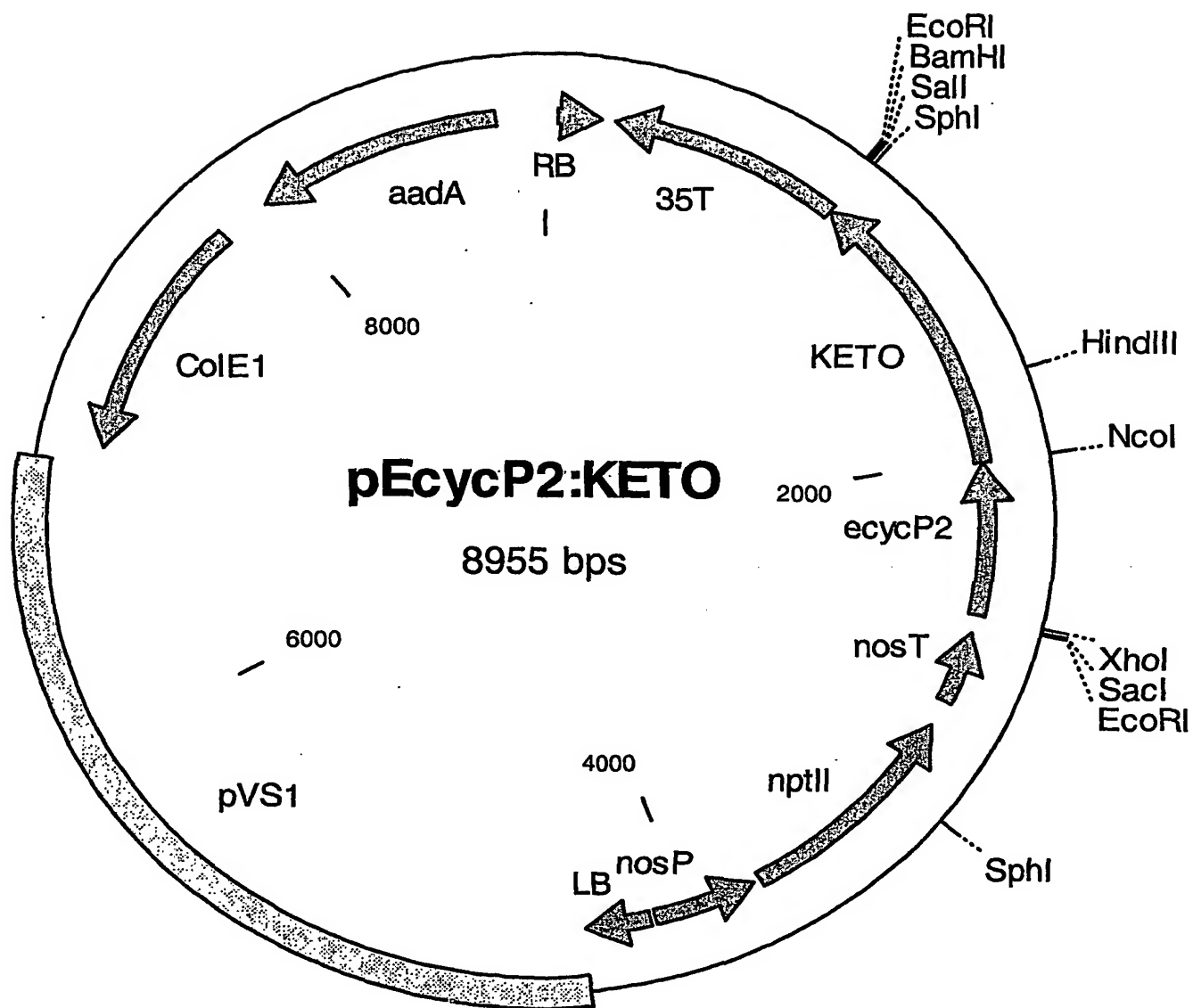


Fig.4

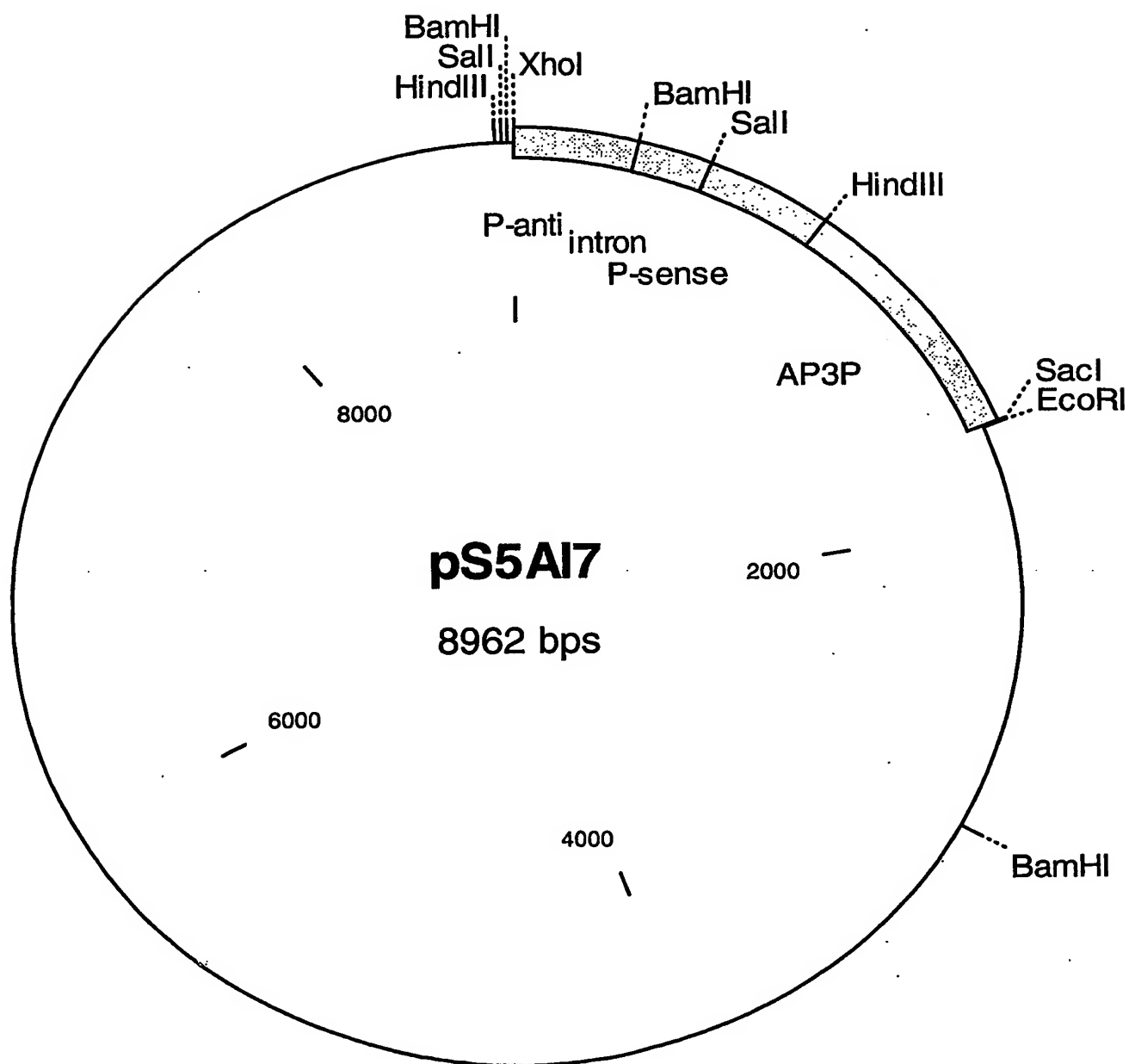


Fig.5

6/15

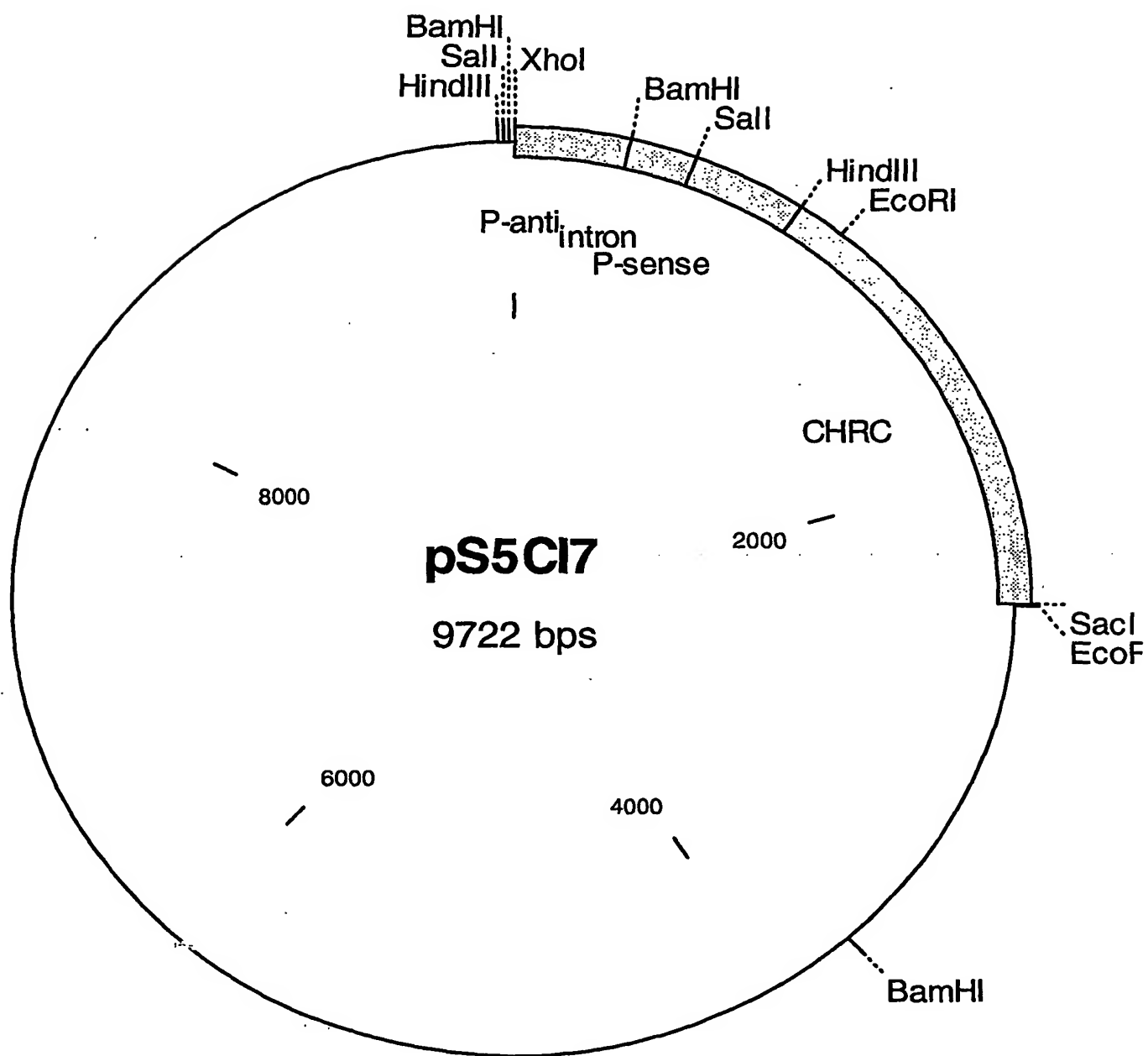


Fig.6

7/15

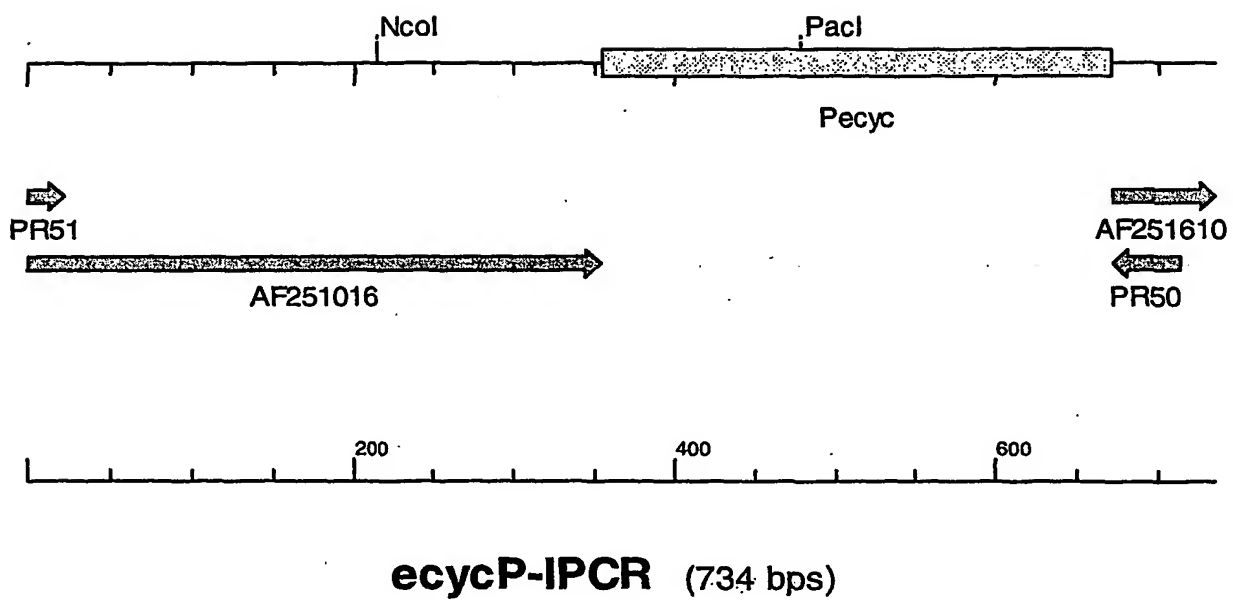


Fig.7



8/15

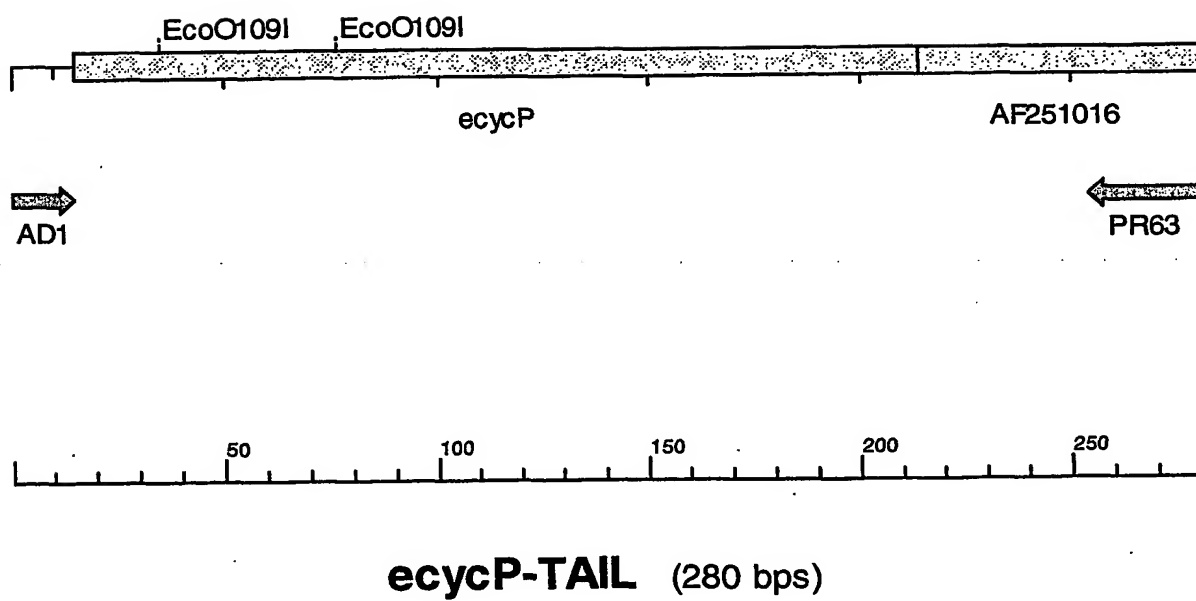


Fig.8



KETO2.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
X86782.pro	MQLAATVMLEQLTGSAEALKEKEKEVAGSSDVLRTWATQYSLPSEESDAA	50
KETO2.pro	RPGLKNA YKPPPSDTKGI TMALAVI GSWA AVFLHAI FQI KLPTSLDQLHW	100
X86782.pro	RPGLKNA YKPPPSDTKGI TMALRVI GSWA AVFLHAI FQI KLPTSLDQLHW	100
KETO2.pro	LPVSDATAQLVSGSSSLLHI VVVFVLEFLYTGLFITTHDAMHGTI AMRN	150
X86782.pro	LPVSDATAQLVSGTSSLLDI VVVFVLEFLYTGLFITTHDAMHGTI AMRN	150
KETO2.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNNMLHRKHWEHHNHTGEVGKDPDFHRGNPGI	200
X86782.pro	RQLNDFLGRVCI SLYAWFDYNNMLHRKHWEHHNHTGEVGKDPDFHRGNPGI	200
KETO2.pro	VPWFASFMSYMSMWQFARLAWWTVVVMQLLGAPMANLLVFMAA API LSAF	250
X86782.pro	VPWFASFMSYMSMWQFARLAWWTVVVMQLLGAPMANLLVFMAA API LSAF	250
KETO2.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQAASDLVSFLT CYHFDL	300
X86782.pro	RLFYFGTYMPHKPEPGAASGSSPAVMNWWKSRTSQAASDLVSFLT CYHFDL	300
KETO2.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLSGRGLVPA	329
X86782.pro	HWEHHRWPFAPWWELPNCRRLSGRGLVPA	329

Fig.10

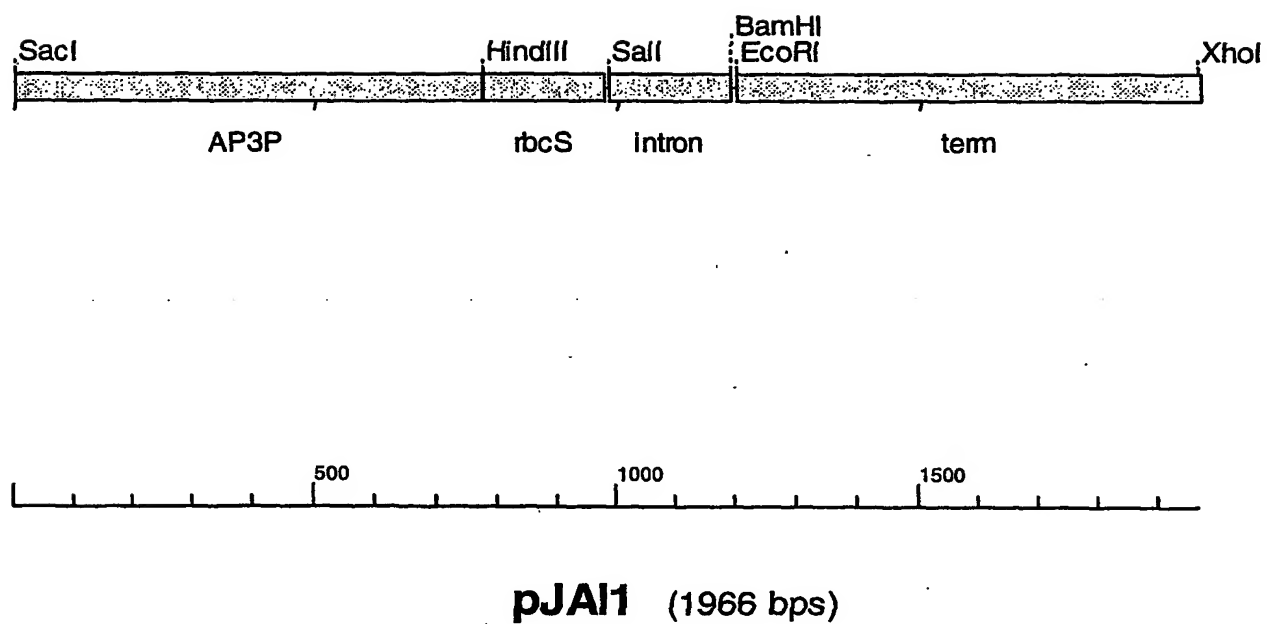


Fig.11

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A	(1)	MLPFLSSLIANGVTNPKRKAMDTLLKTHNKLEFLPQVHGALSKS	---	SSLSLKLQIQQLRFLGKKSRQKRNRSCLIKASSSALLLVLPEIKK	---						
B	(1)										
C	(1)										
D	(1)	MSMRAG	HMATMAAFTCPREMTS	---	TRYTKQIKCNAKSQLVVKQETLE	---	EEEDYVKAGGSELLFVQMQQNK				
E	(1)	MELIGVR	NLISSCPFWTFGIRNLSSSKLAYNIHRYG	---	SSCRVDFQVRADGGSGSRISVAYKEGFVDEDFIKAGGSELLFVQMQQTK	---					
F	(1)	MELIGVR	NLISSCPFWTFGIRNLSSSKLAYNIHRYG	---	SSCRVDFQVRADGGSGSRSSVAYKEGFVDEDFIKAGGSELLFVQMQQTK	---					
G	(1)										
H	(1)	MECFGAR	NMTATMAVFTCPRTFIDNIRHKFSLLKQRRFINL	---	SASSSLRQIKCSAKSDRCVWDKQGLSVADEEDYVKAGGSELLFVQMQQRTK	---					
I	(1)										
J	(1)										
K	(1)										
L	(1)										
M	(1)	MEFSGCATVSAPFGOCRAAMGAAAGACABGRSRW	WPRAVEPRRRGRWVRCVATEKHDAARRGGVEFADEEDYVKGGGSELLVQMQQASK	---	TRYTKQIKCNAKSQLVVKQETLE	---	EEEDYVKAGGSELLFVQMQQNK				
N	(1)	MSMRAG	HMATMAAFTCPREMTS	---	MDTLLKTNKLDFFLPQFHGFER	---	LCNNPYPKRVRLGVKKRAIKIVS	---	SWVSGSAALLDLVPEIKK		
O	(1)	MECVGARNFAAMAVSIFPSSCCRKFFVVKRYSYRNIRFG	---	L-CSVRASGGSGSGSCVAREDFADEEDYVKAGGSELLFVQMQQNK	---						
P	(1)	MECVGVQ	NVGMAMVLRPRIARMSGELQEKSIIF	---	LAVEQYESKCNSSSGSDSCVWDKEDFADEEDYVKAGGSQLFVQMQQKK	---	DEEDYVKAGGSELLFVQMQQ K				
Consensus	(1)										

	(101)	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A	(91)	ENLEFELEPMYDPSK	---	GLVVDLAVVGCGPAGLAVAQQVSGAGLSVCSIDSPKLIWNNYGVWVDEFEAMDLLDCLDTWSGAVWHIDDNKK	---	YGVWVDEFIDIGLEGGCIEHWRDITVYLDGDP	---					
B	(1)											
C	(1)											
D	(69)	SMDAQSSLSQKLPVPIGGGSDNCILDLVIGCGPAGLALAGESAKLGLNVALIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---							
E	(87)	SMEKQAKLADKLPPIPG	---	ESMDLVVIGCGPAGLSIAAFAAKLGLKVGLIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDAPV	---					
F	(87)	SMEKQAKLADKLPPIPG	---	ESMDLVVIGCGPAGLSIAAFAAKLGLKVGLIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDAPV	---					
G	(1)											
H	(92)	SMSQSKLSEKLAQIPIG	---	NCILDLVIGCGPAGLALAGESAKLGLNVALIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---					
I	(1)											
J	(75)	AMDCYSKLSDKLRQISDA	---	NELLDLVVIGCGPAGLALAGESAKLGLKVGLIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---					
K	(1)	MDMFLPPIISIG	---	NGILDVIGCGPAGLALAGESAKLGLNVALIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---					
L	(97)	SMDQSKLSSKLLPIPDEN	---	SVLDLVIGCGPAGLSIAAFAAKLGLNVALIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---					
M	(69)	SMDAQSSLSQKLPVPIGGGSDNCILDLVIGCGPAGLALAGESAKLGLNVALIG	---	PDLPTNNYGVWDEFEAMDLLDCLDTWSGAVWHIDNDPI	---							
N	(66)	ENLDFELPLYDTSK	---	SQWDLAVVIGCGPAGLAVAQVSEAGLSVCSIDSPKLIWNNYGVWDEFEAMDLLDCLDTWSGAVWHIDNDPI	---							
O	(88)	DMDEQSKLVKLPPIISIG	---	DGALDLVIGCGPAGLALAGESAKLGLKVGLIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---					
P	(85)	DMDQSKLSDELRLQISAG	---	QVLDLVVIGCGPAGLALAGESAKLGLNVALIG	---	PDLPTNNYGVWDEDEFKDIGLEGGCIEHWRDITVYLDNDPI	---					
Consensus	(101)	MD QS LS KLP I G										

Fig.12A

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
(201)	DLNRPYGRVNRKLLKSKMLQKCTINGVKFHQAKVTKVTHEE--SKSLICNDGVTIQAAVLDATCFSRCLVQYDKPNP--GYQVAYGILAEVEQHPFDL										
(182)	MIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVEKITEAGDGHSLVBCENNIVIPCRLATVASGAASGKLLQYEVGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(35)	-IGRAYGRVSRDLHHEELLITROMESGVSYSSKVERITEAPNGLSLIECEGNITIPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVCVQIYAGVEVEESIPYDP										
(167)	LIGRAYGRVSRDLHHEELLITROMESGVSYSSKVERITEAPNGLSLIECEGNITIPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVCVQIYAGVEVEESIPYDP										
(180)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVERITEAGDGHSLVBCENNIVIPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(180)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVERITEAGDGHSLVBCENNIVIPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(34)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVEAGVLYNSKVDRIEATINGHSLVBCENNIVIPCRFVIVASGAASGKFLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(185)	RIGRAYGRVSRDLHHEELLKRCVESGVSYSSKVERITEAPNGLSLIECEGNITIPCRLATVASGAASGKFLQYELGGPRVCVQIYAGVEVEENNPYP										
(61)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVESITESTSGHRLVACHHIMIVPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(168)	YIGRSYGVSRDLHHEELLKRCVESGVSYSSKVESITESTSGHRLVACHHIMIVPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(88)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVESITESTSGHRLVACHHIMIVPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(190)	MIGRAYGRVSRDLHHEELLKRCYDAGVTYLSKVDKIMESPDCHRVVCCBCEDEVLICRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVCVQIYAGVEVEENNPYP										
(167)	LIGRAYGRVSRDLHHEELLITROMESGVSYSSKVERITEAPNGLSLIECEGNITIPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVCVQIYAGVEVEESIPYDP										
(157)	DLSPYGRVNRKLLKSKMLQKCTINGVKFHQSKVNVVHEE--ANSTVWCSGVKIQASVLDATCFSRCLVQYDKPNP--GYQVAYGILAEVDGHPFDV										
(181)	TIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVDSTITEASDGLRVACDNNVPCRLATVASGAASGKLLQYELGGPRVCVQIYAGVEVEENNPYP										
(178)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVEAGVLYNSKVDRIEATINGQSLVECEGVVPCRFVIVASGAASGKFLQYELGGPRVSVQIYAGVEVEENNPYP										
(201)	LIGRAYGRVSRHLHHEELLKRCVESGVSYSSKVERITEA GHSLV CE I IPCLATVASGAASGKLL YENGPRVCVQIYAGVEVEENNPYP										
Consensus											
(301)	DKMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(279)	DKMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(135)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(100)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(267)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(280)	NLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(280)	NLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(134)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(285)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(161)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(268)	NLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(188)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(290)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(267)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(254)	DKMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(281)	DKMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
(278)	SLMFMNDYRDYTKVPGME---AEYPTFLYAMP										
Consensus											

Fig.12B



(401) 401 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
 A VLPQRWVGIGGTAGMWHPTGTMVARTLAAPIVANAVRSLS--D-----RSISGKLSAEVWKDIMPERRRQRREFFCFGMDILLIKDLPAIRRRFF  
 B -----  
 C NTEQKNLAFGAAAR-----  
 D NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPNVAATAKILGKNSKQMLDHGRYTN-ISMQAMETLWPLERKRQRAFFLFGIALIVQMDIEGIRUFF  
 E NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKVASVIAKILKQNSAVVSGQSSAVN-ISMQAMSSLWPKERKRQRAFFLFGIELIVQMDIEATRUFF  
 F NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKVASVIAKILKQNSAVVSGQSSAVN-ISMQAMSSLWPKERKRQRAFFLFGIELIVQMDIEATRUFF  
 G NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKCAFLANILRQNHKSNMLTSS-STPS-ISTQAMNVLWPKERKRQRAFFLFGIALILQDIEGIRSEFF  
 H NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPNVAATAKILRQDQSKEMISLGKYN--ISMQAMETLWPLERKRQRAFFLFGILSHIVLMDIEGIRUFF  
 I NTEQKNLAFGAAAS-----  
 J NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKVASAIANILKNDLSKNAIIRQSVEN-ISMQAMNVLWPKERKRQRAFFLFGILSLIVQMDIEGIRUFF  
 K NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPNVAATAYIILKHDSGRUITHQSNEN-ISMQAMNVLWPKERKRQRAFFLFGIALILQDIEGIRUFF  
 L NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKVASVIAKILKQNSAVVSGQSSAVN-ISMQAMSSLWPKERKRQRAFFLFGIALILQDIEGIRUFF  
 M NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPNVAATAKILGKNSKQMLDHGRYTN-ISMQAMETLWPLERKRQRAFFLFGIALIVQMDIEGIRUFF  
 N VLPQRWVGIGGTAGMWHPTGTMVARTLAAPIVANAVRVLGSP-SS-----NSLRGQLSAEVWRDLWPKERKRQRAFFLFGIALILQDIEGIRUFF  
 O NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKVASVIAEILRETT-----KQINEN-ISMQAMNVLWPKERKRQRAFFLFGIALIVQMDIEGIRUFF  
 P NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAPKCAFLANILRQNHKSNMLTSS-SIPS-ISTQAMNVLWPKERKRQRAFFLFGIALILQDIEGIRUFF  
 Consensus (401) NTEQKNLAFGAAASWHPATGYSVRSISEAP YASVIA IIR S L IS QAM TWP ERKRQRAFFLFGIALIVQMDIEGIRUFF

(501) 501 510 520 530 540 550 563  
 A DAFFDLERYWHGFLSSRLFLPELLAFGLSLFSHASNTSRLEIMAKGITPLVNMNNLVQDID  
 B -----  
 C -----  
 D RTFFRLPIWMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 E RTFFRLPIWMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 F RTFFRLPIWMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 G RAFFRVPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 H RTFFRLPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFALYMFVIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 I -----  
 J RTFFRVPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 K RTFFRLPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 L RTFFRLPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 M RTFFRLPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 N DAFFDLQPHYWHGFLSSRLFLPELLVFGLSLFSHASNTSRLEIMAKGITPLVNMNNLVQDID  
 O RTFFRLPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFALYMFVIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 P RAFFRVPKMMWGFGLSSLSSTIDLILFAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLISDPICGIMLKAYLIT  
 Consensus (501) RTFFRLP WMM GFGLSSLS DLILFA YMFIIAPH LRM LVRHLISDPICGIMLKAYLIT

Fig. 12C

15/15

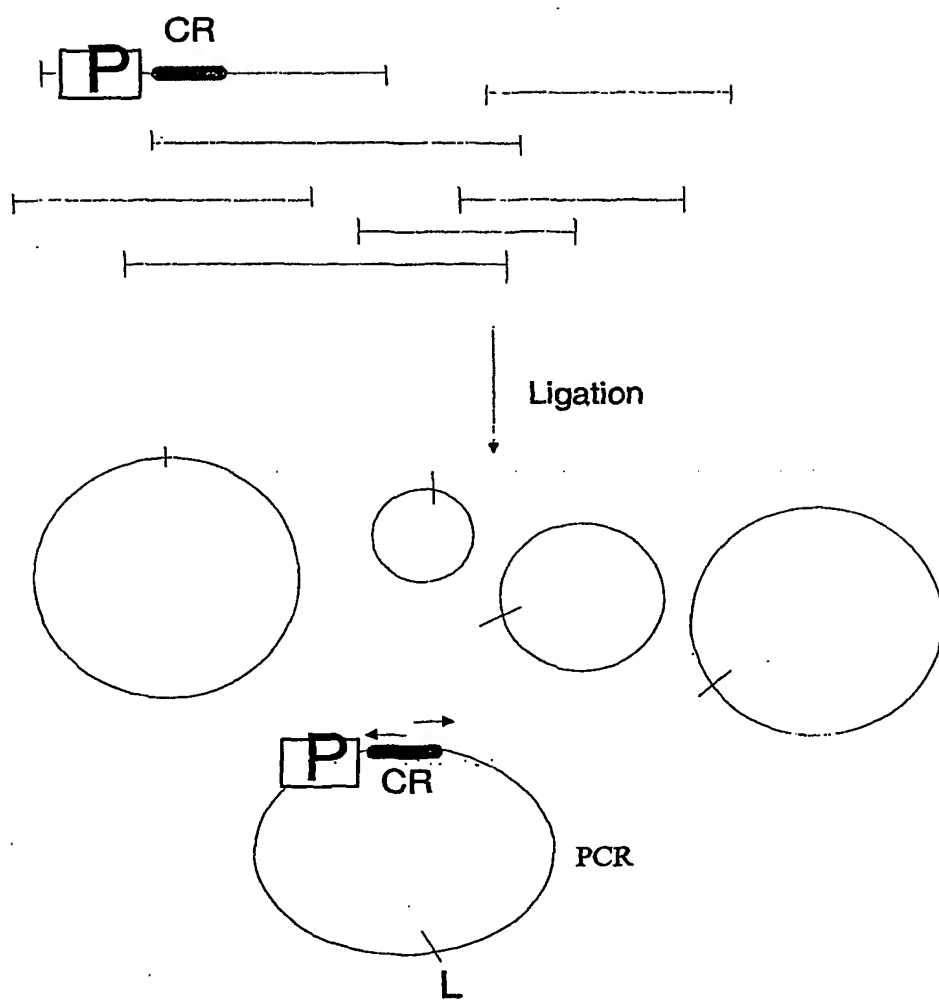


Fig. 13



## SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co.KG&A

<120> Transgene Expressionskassetten zur Expression von  
Nukleinsäuren in der pflanzlichen Blüte

<130> AE20020666

<140>

<141>

<160> 83

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 312

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(312)

<400> 1

```
cgatagtaaa atcgttagtt atgattaata cttgggaggt gggggattat aggctttggt 60
gtgagaatgt tgagaaagag gtttgacaaa tcggtggttg aatgaggtta aatggagttt 120
aattaaaata aagagaagag aaagattaag agggatgatgg ggatattaaa gacggscaat 180
atagtgatgc cacgtagaaa aaggtaagtg aaaacatata acgtggcttt aaaagatggc 240
ttggctgcta atcaactcaa ctcaactcat atcctatcca ttcaaattca attcaattct 300
attgaatgca aa                                     312
```

<210> 2

<211> 447

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(312)

<220>

<221> 5'UTR

<222> (313)..(444)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (445)..(447)

<223> ATG-start codon

<400> 2

```
cgatagtaaa atcgttagtt atgattaata cttgggaggt gggggattat aggctttggt 60
gtgagaatgt tgagaaagag gtttgacaaa tcggtggttg aatgaggtta aatggagttt 120
aattaaaata aagagaagag aaagattaag agggatgatgg ggatattaaa gacggscaat 180
atagtgatgc cacgtagaaa aaggtaagtg aaaacatata acgtggcttt aaaagatggc 240
ttggctgcta atcaactcaa ctcaactcat atcctatcca ttcaaattca attcaattct 300
attgaatgca aagcaaagca aagggtgttt gttgtgtgtg ttgagagaca ctccaatcca 360
aacagatata aggcgtgact ggatattttc ctctcgttcc taacaacagc aacgaagaag 420
aaaaagaatc attactaaca atcaatg                                     447
```

<210> 3

<211> 537

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(312)

```

<220>
<221> 5'UTR
<222> (313)..(444)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (445)..(537)

<220>
<221> CDS
<222> (445)..(537)
<223> coding for transit peptide of epsilon cyclase

<400> 3
cgatagtaaa atcgttagtt atgattaata cttgggaggt gggggattat aggctttggt 60
gtgagaatgt tgagaaagag gtttgacaaa tcggtgtttg aatgagggtta aatggagttt 120
aattaaaata aagagaagag aaagattaag aggggtgatgg ggatattaaa gacggscaat 180
atagtgatgc cacgtagaaa aaggtaagtg aaaacatata acgtggccttt aaaagatggc 240
ttggctgcta atcaactcaa ctcaactcat atcctatcca ttcaaattca attcaattct 300
attgaatgca aagcaaagca aaggttgttt gttgttggtg ttgagagaca ctccaatcca 360
aacagatata aggcgtgact ggatatttct ctctcgttcc taacaacagc aacgaagaag 420
aaaaagaatc attactaaca atca atg agt atg aga gct gga cac atg acg 471
                               Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr
                               1               5

gca aca atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga 519
Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg
 10              15              20              25

tac acg aag caa att aag 537
Tyr Thr Lys Gln Ile Lys
              30

<210> 4
<211> 31
<212> PRT
<213> Tagetes erecta

<400> 4
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
 1               5               10              15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys
 20              25              30

<210> 5
<211> 456
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> restriction site

<220>
<221> misc_feature
<222> (451)..(456)
<223> restriction site

```

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(450)  
<223> coding for promoter and 5'-UTR region

<400> 5  
ctcgagagta aaatcgtttag ttatgattaa tacttggggag gtggggggatt ataggcctttg 60  
ttgtgagaat gttgagaaag aggttttgaca aatcggtggt tgaatgaggt taaatggagt 120  
ttaattaaaa taaagagaag agaaagatta agagggtgat ggggatatta aagacggsca 180  
atatagtgat gccacgtaga aaaaggtaag tgaaaacata caacgtggct ttaaaagatg 240  
gcttggctgc taatcaactc aactcaactc atatcctatc cattcaaatt caattcaatt 300  
ctattgaatg caaagcaaag caaaggttgt ttgttgttgt tgttgagaga cactccaatc 360  
caaacagata caaggcgtga ctggatattt ctctctcggt cctaacaaca gcaacgaaga 420  
agaaaaagaa tcattactaa caatcaatgg ccatgg 456

<210> 6  
<211> 543  
<212> DNA  
<213> Tagetes erecta

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(6)  
<223> restriction site

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (538)..(543)  
<223> restriction site

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(542)  
<223> coding for promoter - 5'-UTR - signal peptide  
region

<400> 6  
ctcgagagta aaatcgtttag ttatgattaa tacttggggag gtggggggatt ataggcctttg 60  
ttgtgagaat gttgagaaag aggttttgaca aatcggtggt tgaatgaggt taaatggagt 120  
ttaattaaaa taaagagaag agaaagatta agagggtgat ggggatatta aagacggsca 180  
atatagtgat gccacgtaga aaaaggtaag tgaaaacata caacgtggct ttaaaagatg 240  
gcttggctgc taatcaactc aactcaactc atatcctatc cattcaaatt caattcaatt 300  
ctattgaatg caaagcaaag caaaggttgt ttgttgttgt tgttgagaga cactccaatc 360  
caaacagata caaggcgtga ctggatattt ctctctcggt cctaacaaca gcaacgaaga 420  
agaaaaagaa tcattactaa caatcaatga gtatgagagc tggacacatg acggcaacaa 480  
tggcggcttt tacatgccct aggtttatga ctagcatcag atacacgaag caaattacca 540  
tgg 543

<210> 7  
<211> 1008  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7  
gaagatgtcg tggacagtta cctagtagaa agccctgaaa ctcacgatgt cactgacttc 60  
tgcagcttct acactctccc ttcaaccatc ctcggttaacc cgaactacac tacattgaaa 120  
gctgcgtatt cttactacaa tgtggccaca cagacctcgt ttcttcagct gatgaatgat 180  
gcgctaattg tctcaaagca aaagggtttc gatgtgttca acgcgttgga tgtgatgcac 240  
aatgagagtt tcttgaaaga actgaagttt gggccaggag atggacaact tcattactat 300  
ctctacaatt accgtttgaa aagtgccttg aagccagcgg aactcgggct tgttctctta 360  
taagctcaac aacttgattt gatggtatca acaaacttga aatttgtctc tctttttttt 420  
tcttcagtct gaactacttc tcccatgggt tactgaaact gagtttaatt attttggcaa 480

```

tgcaatttttg gatttttgctt ttagttttcac ttgtgtttctc tgagagaggtt gaccctgaga 540
agtaaagtca acactagacg tgtgcgagtt tcaatggact gcatttttag gtccaagaag 600
tagctacggc ccatctatcg tagaagttgt tttttgtact aaagcctgtt atagccgaac 660
taggtcgcga cgtttcctaa cttgtcgttt attaggctac ttttaaatacg cacgcacca 720
tccagttctt acacgcgctt tcacaaaaag gaccttacat ggggtgttcc cccaataaga 780
aaattacacg ttgcagaatc gaagcagtgg tctatccttg ttatcgctct ctcgtcttta 840
tggctcttcc aagtcatttt gagaaatttt cgattttgag atttttttcc aaatattaca 900
aaaggaaata attagattcc tctttctgct tgctatacct tgatagaaca atataacaat 960
ggtgtaagtc ttctcgctgt attcgaaatt atttgaggga ggaaaatg 1008

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1169

&lt;212&gt; DNA

<213> *Oryza sativa*

&lt;400&gt; 8

```

agaaggagag agagccggcc ggcgcgacgg cgggtggcagg agaggtggag agagcccgcc 60
gacgcgacgg cggcagtggg agaaaaggag aggaggcggc cggcgctgtc gaacgcgcac 120
gggaagcagc ggacgatgcc gagcaggaca atgtcctcct cgtcaccacc ttcctcatcg 180
tcgtcgcggg cgggtgggtgc cgggcgggag ggtttttgag ggaggggtcg gcggccggcg 240
agcccatccg agctcgctg gcttgcgcga gcccgccctc gctgcagctt ggtgtgctgg 300
ggacgacgag gaggaaggag ggagagagga atcaactacc gacgacagcg gaggcgggag 360
agcgcggtgc cgggctgtc acgctcgccg accaggccct cgtccgtca cactcgctcg 420
cctccgttcc accgcagcc cgcgcgcgtc cgttcgcagc gctcgcccg cgcgcgtccg 480
ctgctgtgca gtcccgccgc cgcgctcgcc ctgactgaag aagaaaagag agaagagaga 540
aaagagaagg gaaggagaag aaaatagaag aaaaaatat gtgcagctga tgtatgagcc 600
ccacatactc ttttttaatc ttttttgctg actacgatgc cacgtcagcg aaaccaccta 660
tatatactac cataggatct tgagtgcacg gtttatatga gtttaggagt atacattttt 720
agttttatgg ttaagggatc ataaaaaatt ctcgctatta agttgagtga cgcgcagtga 780
acttattact caaacttaac agcgtttgat ccattcacat cgggcccata gcagcccata 840
tccagcaacg caccacggtg actgacacgc ggggcccaac gaggtggcgc cgtggcttgg 900
ggggcggtg agtcacgccc tcggcgctgc ccccaaaagc gaaccatata ctttgcttcg 960
tggggccctg cccaatcgcc gcccgccacg tgccccttcc cggataccgc ctccctccaa 1020
accgcgtccc tctccctctc cctcctccta caatggcgc agcagcagca gccagcagca 1080
gacgcagaga ccagtagctt tcgcagaggg ggcagccacc accgcctcct cctcctcctc 1140
ctcatccgac ggtgtgcaac caagcgatg 1169

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1830

&lt;212&gt; DNA

<213> *Tagetes erecta*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (141)..(1688)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 9

```

ggcacgaggg aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60
gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120
agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
1 5 10
atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg 221
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr
15 20 25
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa 269
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln
30 35 40

```

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg	317
Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu	
45 50 55	
ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc	365
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser	
60 65 70 75	
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt	413
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser	
80 85 90	
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt	461
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu	
95 100 105	
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc	509
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile	
110 115 120	
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa	557
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu	
125 130 135	
ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat	605
Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp	
140 145 150 155	
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc	653
Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala	
160 165 170	
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg	701
Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg	
175 180 185	
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att	749
Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile	
190 195 200	
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc	797
Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile	
205 210 215	
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga	845
Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly	
220 225 230 235	
aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893
Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr	
240 245 250	
gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc	941
Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser	
255 260 265	
cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa	989
Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln	
270 275 280	
tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct	1037
Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser	
285 290 295	
cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc	1085
Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala	
300 305 310 315	

atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act 1133  
 Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr  
 320 325 330

atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att 1181  
 Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile  
 335 340 345

cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt 1229  
 Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe  
 350 355 360

ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta 1277  
 Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val  
 365 370 375

aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att 1325  
 Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile  
 380 385 390 395

tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca 1373  
 Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr  
 400 405 410

acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg 1421  
 Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg  
 415 420 425

aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag 1469  
 Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln  
 430 435 440

atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg 1517  
 Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu  
 445 450 455

ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act 1565  
 Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr  
 460 465 470 475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc 1613  
 Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser  
 480 485 490

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga 1661  
 Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly  
 495 500 505

aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taaataactc tagtcgcgat 1708  
 Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 510 515

cagtttagat tataggcaca tcttgcatat atatatgtat aaaccttatg tgtgctgtat 1768  
 ccttacatca acacagtcac taattgtatt tcttggggta atgctgatga agtattttct 1828  
 gg 1830

<210> 10  
 <211> 516  
 <212> PRT  
 <213> Tagetes erecta

<400> 10  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45  
 Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 50 55 60  
 Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
 85 90 95  
 Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
 100 105 110  
 Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
 115 120 125  
 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
 165 170 175  
 Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
 195 200 205  
 Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
 210 215 220  
 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
 245 250 255  
 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
 260 265 270  
 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
 275 280 285  
 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
 290 295 300  
 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
 325 330 335  
 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
 340 345 350  
 Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365  
 Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
 370 375 380  
 Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
 385 390 395 400  
 Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430  
 Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445  
 Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460  
 Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480  
 Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495  
 Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510  
 Tyr Leu Thr Ile  
 515

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1916

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Tagetes erecta

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (173)..(1747)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 11

attcaaattc aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg 60  
 ttgtttgttg agagacactc caatccaaac agatacaagg cgtgactgga tatttctctc 120  
 tcgttcctta acaacagcaa cgaagaagaa aaagaatcat tactcacaat ca atg agt 178  
 Met Ser  
 1  
 atg aga gct gga cac atg acg gca aca atg gcg gct ttt aca tgc cct 226  
 Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro  
 5 10 15  
 agg ttt atg act agc atc aga tac acg aag caa att aag tgc aac gct 274  
 Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala  
 20 25 30  
 gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa gag att gag gag gaa gaa gat 322  
 Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp  
 35 40 45 50  
 tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg ctt ttt gtt caa atg caa cag 370  
 Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met Gln Gln  
 55 60 65  
 aat aag tcc atg gat gca cag tct agc cta tcc caa aag ctc cca agg 418  
 Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg  
 70 75 80  
 gta cca ata gga gga gga gga gac agt aac tgt ata ctg gat ttg gtt 466  
 Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val  
 85 90 95  
 gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt gct ctt gct gga gaa tca gcc 514  
 Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala  
 100 105 110



aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc ggc cct gat ctt cct ttt aca	562
Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr	
115 120 125 130	
aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa ttt ata ggt ctt gga ctt gag	610
Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu	
135 140 145	
ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat act gta gta tat ctt gat gac	658
Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp	
150 155 160	
aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc tat gga cga gtt agt cgt gat	706
Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp	
165 170 175	
tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg tgc atg gag tca ggc gtt tca	754
Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly Val Ser	
180 185 190	
tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att act gaa gct cca aat ggc cta	802
Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu	
195 200 205 210	
agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc aca att cca tgc agg ctt gct	850
Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala	
215 220 225	
act gtc gct tct gga gca gct tct ggg aaa ctt ttg cag tat gaa ctt	898
Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu	
230 235 240	
ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca gct tat ggt tac gag gtt gag	946
Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Tyr Glu Val Glu	
245 250 255	
gtt gaa agc ata ccc tat gat cca agc cta atg gtt ttc atg gat tat	994
Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr	
260 265 270	
aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa tca cta gaa gca caa tat cca	1042
Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro	
275 280 285 290	
aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct cca act aaa gta ttc ttt gag	1090
Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu	
295 300 305	
gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc atg cct ttt gag tta ttg aag	1138
Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys	
310 315 320	
aca aaa ctc atg tca aga tta aag act atg ggg atc cga ata acc aaa	1186
Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys	
325 330 335	
act tat gaa gag tat ctt gtt gct tgt caa tat ttg gaa gaa tgg tca	1234
Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Val Ala Cys Gln Tyr Leu Glu Glu Trp Ser	
340 345 350	
tat att cca gta ggt gga tcc ctt cca aat acc gag caa aag aac ctt	1282
Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu	
355 360 365 370	
gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg	1330
Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser	
375 380 385	

gtt gta aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca 1378  
 Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala  
 390 395 400

aag att tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat ctt gga aga 1426  
 Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp Leu Gly Arg  
 405 410 415

tac aca acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt 1474  
 Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu  
 420 425 430

gaa agg aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att 1522  
 Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile  
 435 440 445 450

gtc cag atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc 1570  
 Val Gln Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe  
 455 460 465

cgc ttg ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca 1618  
 Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser  
 470 475 480

tca act gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg 1666  
 Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro  
 485 490 495

cat agc ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca 1714  
 His Ser Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr  
 500 505 510

gga gga aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taaataactc tagtcgcgat 1767  
 Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile  
 515 520 525

cagtttagat tataggcaca tcttgcatat atatatgtat aaaccttatg tgtgctgtat 1827  
 ccttacatca acacagtcac taattgtatt tcttggggta atgctgatga agtattttct 1887  
 ggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1916

<210> 12  
 <211> 525  
 <212> PRT  
 <213> Tagetes erecta

<400> 12  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr  
 1 5 10 15  
 Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys  
 20 25 30  
 Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu  
 35 40 45  
 Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 50 55 60  
 Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp  
 85 90 95  
 Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu  
 100 105 110

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro  
 115 120 125  
 Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
 130 135 140  
 Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
 165 170 175  
 Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
 180 185 190  
 Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
 195 200 205  
 Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
 210 215 220  
 Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
 225 230 235 240  
 Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Tyr Glu  
 245 250 255  
 Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
 260 265 270  
 Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
 275 280 285  
 Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
 290 295 300  
 Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
 325 330 335  
 Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Val Ala Cys Gln Tyr Leu Glu Glu  
 340 345 350  
 Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys  
 355 360 365  
 Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly  
 370 375 380  
 Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val  
 385 390 395 400  
 Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp Leu  
 405 410 415  
 Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp  
 420 425 430  
 Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala  
 435 440 445  
 Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr  
 450 455 460  
 Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser  
 465 470 475 480  
 Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile  
 485 490 495

9

cat	gtt	tgg	aga	gag	act	att	gtg	tat	ctg	gat	gat	gac	aag	cct	att	643
His	Val	Trp	Arg	Glu	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asp	Lys	Pro	Ile	
165					170					175					180	

acc att ggc cgt gct tat gga aga gtt agt cga cgt ttg ctc cat gag	691
Thr Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg Arg Leu Leu His Glu	
185 190 195	
gag ctt ttg agg agg tgt gtc gag tca ggt gtc tcg tac ctt agc tcg	739
Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser	
200 205 210	
aaa gtt gac agc ata aca gaa gct tct gat ggc ctt aga ctt gtt gct	787
Lys Val Asp Ser Ile Thr Glu Ala Ser Asp Gly Leu Arg Leu Val Ala	
215 220 225	
tgt gac gac aat aac gtc att ccc tgc agg ctt gcc act gtt gct tct	835
Cys Asp Asp Asn Asn Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser	
230 235 240	
gga gca gct tcg gga aag ctc ttg caa tac gaa gtt ggt gga cct aga	883
Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg	
245 250 255 260	
gtc tgt gtg caa act gca tac ggc gtg gag gtt gag gtg gaa aat agt	931
Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Ser	
265 270 275	
cca tat gat cca gat caa atg gtt ttc atg gat tac aga gat tat act	979
Pro Tyr Asp Pro Asp Gln Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr	
280 285 290	
aac gag aaa gtt cgg agc tta gaa gct gag tat cca acg ttt ctg tac	1027
Asn Glu Lys Val Arg Ser Leu Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr	
295 300 305	
gcc atg cct atg aca aag tca aga ctc ttc ttc gag gag aca tgt ttg	1075
Ala Met Pro Met Thr Lys Ser Arg Leu Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu	
310 315 320	
gcc tca aaa gat gtc atg ccc ttt gat ttg cta aaa acg aag ctc atg	1123
Ala Ser Lys Asp Val Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met	
325 330 335 340	
tta aga tta gat aca ctc gga att cga att cta aag act tac gaa gag	1171
Leu Arg Leu Asp Thr Leu Gly Ile Arg Ile Leu Lys Thr Tyr Glu Glu	
345 350 355	
gag tgg tcc tat atc cca gtt ggt ggt tcc ttg cca aac acc gaa caa	1219
Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln	
360 365 370	
aag aat ctc gcc ttt ggt gct gcc gct agc atg gta cat ccc gca aca	1267
Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr	
375 380 385	
ggc tat tca gtt gtg aga tct ttg tct gaa gct cca aaa tat gca tca	1315
Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr Ala Ser	
390 395 400	
gtc atc gca gag ata cta aga gaa gag act acc aaa cag atc aac agt	1363
Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Glu Glu Thr Thr Lys Gln Ile Asn Ser	
405 410 415 420	
aat att tca aga caa gct tgg gat act tta tgg cca cca gaa agg aaa	1411
Asn Ile Ser Arg Gln Ala Trp Asp Thr Leu Trp Pro Pro Glu Arg Lys	
425 430 435	
aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt ggt ctt gca ctc ata gtt caa ttc	1459
Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Phe	
440 445 450	

gat acc gaa ggc att aga agc ttc ttc cgt act ttc ttc cgc ctt cca 1507  
 Asp Thr Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro  
 455 460 465

aaa tgg atg tgg caa ggg ttt cta gga tca aca tta aca tca gga gat 1555  
 Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser Thr Leu Thr Ser Gly Asp  
 470 475 480

ctc gtt ctc ttt gct tta tac atg ttc gtc att tca cca aac aat ttg 1603  
 Leu Val Leu Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ser Pro Asn Asn Leu  
 485 490 495 500

aga aaa ggt ctc atc aat cat ctc atc tct gat cca acc gga gca acc 1651  
 Arg Lys Gly Leu Ile Asn His Leu Ile Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr  
 505 510 515

atg ata aaa acc tat ctc aaa gta tgatttactt atcaactctt aggtttgtgt 1705  
 Met Ile Lys Thr Tyr Leu Lys Val  
 520

atatatatgt tgatttatct gaataatcga tcaaagaatg gtatgtgggt tactaggaag 1765  
 ttggaaacaa acatgtatag aatctaagga gtgatcgaaa tggagatgga aac 1818

<210> 14

<211> 524

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

Met Glu Cys Val Gly Ala Arg Asn Phe Ala Ala Met Ala Val Ser Thr  
 1 5 10 15

Phe Pro Ser Trp Ser Cys Arg Arg Lys Phe Pro Val Val Lys Arg Tyr  
 20 25 30

Ser Tyr Arg Asn Ile Arg Phe Gly Leu Cys Ser Val Arg Ala Ser Gly  
 35 40 45

Gly Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ser Cys Val Ala Val Arg Glu Asp Phe  
 50 55 60

Ala Asp Glu Glu Asp Phe Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Ile Leu Phe  
 65 70 75 80

Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Asp Met Asp Glu Gln Ser Lys Leu Val  
 85 90 95

Asp Lys Leu Pro Pro Ile Ser Ile Gly Asp Gly Ala Leu Asp Leu Val  
 100 105 110

Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala  
 115 120 125

Lys Leu Gly Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr  
 130 135 140

Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Asn Asp Leu Gly Leu Gln  
 145 150 155 160

Lys Cys Ile Glu His Val Trp Arg Glu Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp  
 165 170 175

Asp Lys Pro Ile Thr Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg Arg  
 180 185 190

Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser  
 195 200 205

Tyr Leu Ser Ser Lys Val Asp Ser Ile Thr Glu Ala Ser Asp Gly Leu  
 210 215 220  
 Arg Leu Val Ala Cys Asp Asp Asn Asn Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala  
 225 230 235 240  
 Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val  
 245 250 255  
 Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu  
 260 265 270  
 Val Glu Asn Ser Pro Tyr Asp Pro Asp Gln Met Val Phe Met Asp Tyr  
 275 280 285  
 Arg Asp Tyr Thr Asn Glu Lys Val Arg Ser Leu Glu Ala Glu Tyr Pro  
 290 295 300  
 Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Met Thr Lys Ser Arg Leu Phe Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Val Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys  
 325 330 335  
 Thr Lys Leu Met Leu Arg Leu Asp Thr Leu Gly Ile Arg Ile Leu Lys  
 340 345 350  
 Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro  
 355 360 365  
 Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val  
 370 375 380  
 His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro  
 385 390 395 400  
 Lys Tyr Ala Ser Val Ile Ala Glu Ile Leu Arg Glu Glu Thr Thr Lys  
 405 410 415  
 Gln Ile Asn Ser Asn Ile Ser Arg Gln Ala Trp Asp Thr Leu Trp Pro  
 420 425 430  
 Pro Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu  
 435 440 445  
 Ile Val Gln Phe Asp Thr Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg Thr Phe  
 450 455 460  
 Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser Thr Leu  
 465 470 475 480  
 Thr Ser Gly Asp Leu Val Leu Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ser  
 485 490 495  
 Pro Asn Asn Leu Arg Lys Gly Leu Ile Asn His Leu Ile Ser Asp Pro  
 500 505 510  
 Thr Gly Ala Thr Met Ile Lys Thr Tyr Leu Lys Val  
 515 520

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1623

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1620)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 15

atg gag ttc tcc ggc ggc gcg acc gtg tcg gcg ccg ttc ggt tgc tgc	48
Met Glu Phe Ser Gly Gly Ala Thr Val Ser Ala Pro Phe Gly Cys Cys	
1 5 10 15	
cg t gcg gcg tgg ggc gcc gcg gcg gcg ggt gcg ggg gcg gag gga agg	96
Arg Ala Ala Trp Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Glu Gly Arg	
20 25 30	
agc agg agg gtt gtg ccg cgc gcg gtg gag ccg cgg cgg cgc ggg cgg	144
Ser Arg Arg Val Val Pro Arg Ala Val Glu Pro Arg Arg Arg Gly Arg	
35 40 45	
tgg atg gtg agg tgc gtg gcg acg gag aag cac aag gac gcg gcg gcg	192
Trp Met Val Arg Cys Val Ala Thr Glu Lys His Lys Asp Ala Ala Ala	
50 55 60	
cgg cgc ggc ggc gtg gag gtg gag ttc gcc gac gag gag gac tac gtc	240
Arg Arg Gly Gly Val Glu Val Glu Phe Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val	
65 70 75 80	
aag ggc ggc ggc ggc gag ctt ctc tac gtg caa atg cag gcg tcc aag	288
Lys Gly Gly Gly Gly Glu Leu Leu Tyr Val Gln Met Gln Ala Ser Lys	
85 90 95	
tcc atg gac agc cag tcc aag atc tcc tcc aag ctg ctg ccc ata ccc	336
Ser Met Asp Ser Gln Ser Lys Ile Ser Ser Lys Leu Leu Pro Ile Pro	
100 105 110	
gat gaa aat tca gtt ctt gat ttg gtc atc att ggc tgc ggt cca gct	384
Asp Glu Asn Ser Val Leu Asp Leu Val Ile Ile Gly Cys Gly Pro Ala	
115 120 125	
ggc tta tcc cta gca gca gag tca gct aag aaa ggg ctc aat gtt ggt	432
Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Lys Gly Leu Asn Val Gly	
130 135 140	
ctc att ggc cct gat ctt cca ttc acg aac aac tac ggt gtg tgg gag	480
Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu	
145 150 155 160	
gat gaa ttc aaa gac ctg ggc ctg gag agc tgc att gaa cat gtc tgg	528
Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Ser Cys Ile Glu His Val Trp	
165 170 175	
aag gat act atc gtg tac cta gac ggt aac aag cca ata atg att ggc	576
Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Asn Lys Pro Ile Met Ile Gly	
180 185 190	
cg t gcg tat ggc agg gtt cac agg gac ttg ctg cac gag gag ttg ctg	624
Arg Ala Tyr Gly Arg Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu	
195 200 205	
aga cga tgc tat gac gct ggc gtc aca tac ctc agc tcg aag gtg gac	672
Arg Arg Cys Tyr Asp Ala Gly Val Thr Tyr Leu Ser Ser Lys Val Asp	
210 215 220	
aag atc atg gaa tct cct gat gga cat cgg gta gtc tgt tgt gaa ggg	720
Lys Ile Met Glu Ser Pro Asp Gly His Arg Val Val Cys Cys Glu Gly	
225 230 235 240	
gat cg t gag gta ctt tgc agg ctt gcc att gtt gca tct ggg gca gca	768
Asp Arg Glu Val Leu Cys Arg Leu Ala Ile Val Ala Ser Gly Ala Ala	
245 250 255	
tct ggt agg ctt cta gag tac gag gtt ggt ggt ccg cg t gtt tgt gtg	816
Ser Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg Val Cys Val	
260 265 270	



cag act gca tat ggt gtc gaa gtc gag gtg gaa aac aat cca tat gat	864
Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp	
275 280 285	
ccc agc tta atg gtt ttc atg gac tac aga gat tgc ttc aaa gac aaa	912
Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Phe Lys Asp Lys	
290 295 300	
ttc tca cat cct gag caa gga aat cca acg ttc ctc tat gcc atg ccc	960
Phe Ser His Pro Glu Gln Gly Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
305 310 315 320	
atg tca tcc aca cga att ttc ttt gag gaa aca tgc cta gct tct aaa	1008
Met Ser Ser Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys	
325 330 335	
gaa gca atg ccc ttt gac ctc ctt aaa aag cgg ttg atg tct cgg ttg	1056
Glu Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Arg Leu Met Ser Arg Leu	
340 345 350	
gat gca atg gga gtt cat att cga aaa gta tac gag gag gaa tgg tcc	1104
Asp Ala Met Gly Val His Ile Arg Lys Val Tyr Glu Glu Glu Trp Ser	
355 360 365	
tac att cct gtt gga ggg tcc tta cca aat aca gac cag aaa aat ctc	1152
Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Asp Gln Lys Asn Leu	
370 375 380	
gca ttt ggt gcg gca gca agt atg gtg cat cct gca acc gga tac tcg	1200
Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser	
385 390 395 400	
gtg gtt aga tca ttg tct gaa gct cca aga tat gca tct gtg ata tct	1248
Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Arg Tyr Ala Ser Val Ile Ser	
405 410 415	
gat atc ttg aga aac cgt gtc tac cct gga gaa tat ttg cct gga acc	1296
Asp Ile Leu Arg Asn Arg Val Tyr Pro Gly Glu Tyr Leu Pro Gly Thr	
420 425 430	
tct caa agt tcc agt cca tca atg ctt gca tgg aga aca tta tgg ccc	1344
Ser Gln Ser Ser Ser Pro Ser Met Leu Ala Trp Arg Thr Leu Trp Pro	
435 440 445	
caa gaa cgg aaa cgt caa cga tca ttc ttc ctt ttt ggg ctg gct ttg	1392
Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu	
450 455 460	
ata atc caa ctg aat aac gaa ggc att cag aca ttc ttt gaa acc ttt	1440
Ile Ile Gln Leu Asn Asn Glu Gly Ile Gln Thr Phe Phe Glu Thr Phe	
465 470 475 480	
ttc cgg ttg ccc aaa tgg atg tgg cga gga ttc ctt ggt tcg acg ctt	1488
Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met Trp Arg Gly Phe Leu Gly Ser Thr Leu	
485 490 495	
tct tca gtg gat ctc ata ctc ttt gca ttc tac atg ttc aca att gcg	1536
Ser Ser Val Asp Leu Ile Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Thr Ile Ala	
500 505 510	
ccg aac caa atg cga atg aac ctt gtc aga cat ctc ctc tct gat ccg	1584
Pro Asn Gln Met Arg Met Asn Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro	
515 520 525	
acc ggc tca acg atg atc aag acc tac ctg acc ttg taa	1623
Thr Gly Ser Thr Met Ile Lys Thr Tyr Leu Thr Leu	
530 535 540	

**<211> 540**

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 16

Met Glu Phe Ser Gly Gly Ala Thr Val Ser Ala Pro Phe Gly Cys Cys  
1 5 10 15

Arg Ala Ala Trp Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Glu Gly Arg  
20 25 30

Ser Arg Arg Val Val Pro Arg Ala Val Glu Pro Arg Arg Arg Gly Arg  
35 40 45

Trp Met Val Arg Cys Val Ala Thr Glu Lys His Lys Asp Ala Ala Ala  
50 55 60

Arg Arg Gly Gly Val Glu Val Glu Phe Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val  
65 70 75 80

Lys Gly Gly Gly Gly Glu Leu Leu Tyr Val Gln Met Gln Ala Ser Lys  
85 90 95

Ser Met Asp Ser Gln Ser Lys Ile Ser Ser Lys Leu Leu Pro Ile Pro  
100 105 110

Asp Glu Asn Ser Val Leu Asp Leu Val Ile Ile Gly Cys Gly Pro Ala  
115 120 125

Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Lys Gly Leu Asn Val Gly  
130 135 140

Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu  
145 150 155 160

Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Ser Cys Ile Glu His Val Trp  
165 170 175

Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Asn Lys Pro Ile Met Ile Gly  
180 185 190

Arg Ala Tyr Gly Arg Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu  
195 200 205

Arg Arg Cys Tyr Asp Ala Gly Val Thr Tyr Leu Ser Ser Lys Val Asp  
210 215 220

Lys Ile Met Glu Ser Pro Asp Gly His Arg Val Val Cys Cys Glu Gly  
225 230 235 240

Asp Arg Glu Val Leu Cys Arg Leu Ala Ile Val Ala Ser Gly Ala Ala  
245 250 255

Ser Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg Val Cys Val  
260 265 270

Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp  
275 280 285

Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Phe Lys Asp Lys  
290 295 300

Phe Ser His Pro Glu Gln Gly Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
305 310 315 320

Met Ser Ser Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys  
325 330 335

Glu Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Arg Leu Met Ser Arg Leu  
340 345 350

<211> 10

<212> PR

<213> Kü

— — —

<223> Be

mo

<221> VA

<222> (2

$\langle 223 \rangle$  G/

1220-57

<221> VA

<222> (8

$\langle 223 \rangle$  A/

**000**

<221> VA

$\langle 222 \rangle$  (9

 $\langle 223 \rangle$  V/

42250

Glv Glv

1

 $\langle 211 \rangle$  8

1111

<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> L/I variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> N/G/S variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> K/R variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (8)  
<223> V/L variation  
<400> 18  
Leu Asn Arg Xaa Tyr Gly Lys Val  
1 5  
<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Y/W variation  
<400> 19  
Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp  
1 5  
<210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> A/V variation  
<220>  
<221> VARIANT

<222> (8)  
<223> P/A variation  
<400> 20  
Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro  
1 5  
<210> 21  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> S/A-variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (11)  
<223> M/S variation  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (13)  
<223> A/V variation  
<400> 21  
Ala Xaa Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala Arg  
1 5 10  
<210> 22  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive for epsilon cyclase  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> R/K variation  
<400> 22  
Leu Trp Pro Xaa Glu Arg Arg Arg Gln Arg Xaa Phe Phe  
1 5 10  
<210> 23  
<211> 1780  
<212> DNA  
<213> Lactuca sativa  
<220>  
<221> CDS  
<222> (77)..(1675)  
<223> coding for epsilon-cyclase  
<400> 23  
gaaacaaatg acgtgaaagt tcttcaaaat tgaatttaatt gtaatcctga aaacttgatt 60

tgtgatagaa gaatca atg gag tgc ttt gga gct cga aac atg acg gca aca 112  
 Met Glu Cys Phe Gly Ala Arg Asn Met Thr Ala Thr  
 1 5 10

atg gcg gtt ttt acg tgc cct aga ttc acg gac tgt aat atc agg cac 160  
 Met Ala Val Phe Thr Cys Pro Arg Phe Thr Asp Cys Asn Ile Arg His  
 15 20 25

aaa ttt tcg tta ctg aaa caa cga aga ttt act aat tta tca gca tcg 208  
 Lys Phe Ser Leu Leu Lys Gln Arg Arg Phe Thr Asn Leu Ser Ala Ser  
 30 35 40

tct tcg ttg cgt caa att aag tgc agc gct aaa agc gac cgt tgt gta 256  
 Ser Ser Leu Arg Gln Ile Lys Cys Ser Ala Lys Ser Asp Arg Cys Val  
 45 50 55 60

gtg gat aaa caa ggg att tcc gta gca gac gaa gaa gat tat gtg aag 304  
 Val Asp Lys Gln Gly Ile Ser Val Ala Asp Glu Glu Asp Tyr Val Lys  
 65 70 75

gcc ggt gga tcg gag ctg ttt ttt gtt caa atg cag cgg act aag tcc 352  
 Ala Gly Gly Ser Glu Leu Phe Phe Val Gln Met Gln Arg Thr Lys Ser  
 80 85 90

atg gaa agc cag tct aaa ctt tcc gaa aag cta gca cag ata cca att 400  
 Met Glu Ser Gln Ser Lys Leu Ser Glu Lys Leu Ala Gln Ile Pro Ile  
 95 100 105

gga aat tgc ata ctt gat ctg gtt gta atc ggt tgt ggc cct gct ggc 448  
 Gly Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly  
 110 115 120

ctt gct ctt gct gca gag tca gcc aaa cta ggg ttg aac gtt gga ctc 496  
 Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu  
 125 130 135 140

att ggc cct gat ctt cct ttt aca aac aat tat ggt gtt tgg cag gat 544  
 Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Gln Asp  
 145 150 155

gaa ttt ata ggt ctt gga ctt gaa gga tgc att gaa cat tct tgg aaa 592  
 Glu Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Ser Trp Lys  
 160 165 170

gat act ctt gta tac ctt gat gat gct gat ccc atc cgc ata ggt cgt 640  
 Asp Thr Leu Val Tyr Leu Asp Asp Ala Asp Pro Ile Arg Ile Gly Arg  
 175 180 185

gca tat ggc aga gtt cat cgt gat tta ctt cat gaa gag ttg tta aga 688  
 Ala Tyr Gly Arg Val His Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg  
 190 195 200

agg tgt gtg gaa tca ggt gtt tca tat cta agc tcc aaa gta gaa aga 736  
 Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg  
 205 210 215 220

atc act gaa gct cca aat ggc tat agt ctc att gaa tgt gaa ggc aat 784  
 Ile Thr Glu Ala Pro Asn Gly Tyr Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn  
 225 230 235

atc acc att cca tgc agg ctt gct act gtt gca tca ggg gca gct tca 832  
 Ile Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser  
 240 245 250

ggg aaa ttt ctg gag tat gaa ctt ggg ggt ccc cgt gtt tgt gtc caa 880  
 Gly Lys Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln  
 255 260 265

aca gct tat ggt ata gag gtt gag gtt gaa aac aac ccc tat gat cca	928
Thr Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro	
270 275 280	
gat cta atg gtg ttc atg gat tat aga gac ttc tca aaa cat aaa ccg	976
Asp Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Phe Ser Lys His Lys Pro	
285 290 295 300	
gaa tct tta gaa gca aaa tat ccg act ttc ctc tat gtc atg gcc atg	1024
Glu Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Ala Met	
305 310 315	
tct cca aca aaa ata ttc ttc gag gaa act tgt tta gct tca aga gaa	1072
Ser Pro Thr Lys Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Arg Glu	
320 325 330	
gcc atg cct ttc aat ctt cta aag tcc aaa ctc atg tca cga tta aag	1120
Ala Met Pro Phe Asn Leu Leu Lys Ser Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys	
335 340 345	
gca atg ggt atc cga ata aca aga acg tac gaa gag gaa tgg tcg tat	1168
Ala Met Gly Ile Arg Ile Thr Arg Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr	
350 355 360	
atc ccc gta ggt gga tcg tta cct aat aca gaa caa aag aat ctc gca	1216
Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala	
365 370 375 380	
ttt ggt gct gca gct agt atg gtg cac cct gcc aca ggg tat tca gtt	1264
Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val	
385 390 395	
gtt cga tct ttg tca gaa gct cct aat tat gca gca gtc att gct aag	1312
Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys	
400 405 410	
att tta aga caa gat caa tct aaa gag atg att tct ctt gga aaa tac	1360
Ile Leu Arg Gln Asp Gln Ser Lys Glu Met Ile Ser Leu Gly Lys Tyr	
415 420 425	
act aac att tca aaa caa gca tgg gaa aca ttg tgg cca ctt gaa agg	1408
Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg	
430 435 440	
aaa aga cag cga gcc ttc ttt cta ttc gga cta tca cac atc gtg cta	1456
Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser His Ile Val Leu	
445 450 455 460	
atg gat cta gag gga aca cgt aca ttt ttc cgt act ttc ttt cgt ttg	1504
Met Asp Leu Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu	
465 470 475	
ccc aaa tgg atg tgg tgg gga ttt ttg ggg tct tct tta tct tca acg	1552
Pro Lys Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr	
480 485 490	
gat ttg ata ata ttt gcg ctt tat atg ttt gtg ata gca cct cac agc	1600
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ala Pro His Ser	
495 500 505	
ttg aga atg gaa ctg gtt aga cat cta ctt tct gat ccg aca ggg gca	1648
Leu Arg Met Glu Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Ala	
510 515 520	
act atg gta aaa gca tat ctc act ata tagatttaga ttatataaat	1695
Thr Met Val Lys Ala Tyr Leu Thr Ile	
525 530	

aatacccata tcttgcatat atataagcct tattttatttc ttttgtatcc ttacaacaac 1755  
 atactcggtta attatatggtt ttttta 1780

<210> 24

<211> 533

<212> PRT

<213> Lactuca sativa

<400> 24

Met	Glu	Cys	Phe	Gly	Ala	Arg	Asn	Met	Thr	Ala	Thr	Met	Ala	Val	Phe	1	5	10	15
Thr	Cys	Pro	Arg	Phe	Thr	Asp	Cys	Asn	Ile	Arg	His	Lys	Phe	Ser	Leu	20	25	30	
Leu	Lys	Gln	Arg	Arg	Phe	Thr	Asn	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Arg	35	40	45	
Gln	Ile	Lys	Cys	Ser	Ala	Lys	Ser	Asp	Arg	Cys	Val	Val	Asp	Lys	Gln	50	55	60	
Gly	Ile	Ser	Val	Ala	Asp	Glu	Glu	Asp	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	65	70	75	80
Glu	Leu	Phe	Phe	Val	Gln	Met	Gln	Arg	Thr	Lys	Ser	Met	Glu	Ser	Gln	85	90	95	
Ser	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Ala	Gln	Ile	Pro	Ile	Gly	Asn	Cys	Ile	100	105	110	
Leu	Asp	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	115	120	125	
Ala	Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Asn	Val	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Asp	130	135	140	
Leu	Pro	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Gln	Asp	Glu	Phe	Ile	Gly	145	150	155	160
Leu	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Ser	Trp	Lys	Asp	Thr	Leu	Val	165	170	175	
Tyr	Leu	Asp	Asp	Ala	Asp	Pro	Ile	Arg	Ile	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Arg	180	185	190	
Val	His	Arg	Asp	Leu	Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Arg	Arg	Cys	Val	Glu	195	200	205	
Ser	Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	210	215	220	
Pro	Asn	Gly	Tyr	Ser	Leu	Ile	Glu	Cys	Glu	Gly	Asn	Ile	Thr	Ile	Pro	225	230	235	240
Cys	Arg	Leu	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Phe	Leu	245	250	255	
Glu	Tyr	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	260	265	270	
Ile	Glu	Val	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Pro	Tyr	Asp	Pro	Asp	Leu	Met	Val	275	280	285	
Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	Phe	Ser	Lys	His	Lys	Pro	Glu	Ser	Leu	Glu	290	295	300	
Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Ala	Met	Ser	Pro	Thr	Lys	305	310	315	320



Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Arg Glu Ala Met Pro Phe  
 325 330 335  
 Asn Leu Leu Lys Ser Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Ala Met Gly Ile  
 340 345 350  
 Arg Ile Thr Arg Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly  
 355 360 365  
 Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala  
 370 375 380  
 Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Arg Gln  
 405 410 415  
 Asp Gln Ser Lys Glu Met Ile Ser Leu Gly Lys Tyr Thr Asn Ile Ser  
 420 425 430  
 Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg  
 435 440 445  
 Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser His Ile Val Leu Met Asp Leu Glu  
 450 455 460  
 Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met  
 465 470 475 480  
 Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile  
 485 490 495  
 Phe Ala Leu Tyr Met Phe Val Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Glu  
 500 505 510  
 Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Val Lys  
 515 520 525  
 Ala Tyr Leu Thr Ile  
 530

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 1848

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Adonis palaestina

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (116)..(1702)

&lt;223&gt; coding for epsilon cyclase

&lt;400&gt; 25

gagagaaaaa gagtgttata ttaatgttac tgtcgcattc ttgcaacaca tattcagact 60  
 ccattttctt gttttctctt caaaacaaca aactaatgtg acggagtatc tagct atg 118  
 Met  
 1

gaa cta ctt ggt gtt cgc aac ctc atc tct tct tgc cct gtc tgg act 166  
 Glu Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp Thr  
 5 10 15

ttt gga aca aga aac ctt agt agt tca aaa cta gct tat aac ata cat 214  
 Phe Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile His  
 20 25 30

cga tat ggt tct tct tgt aga gta gat ttt caa gtg agg gct gat ggt	262
Arg Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp Gly	
35 40 45	
gga agc ggg agt aga act tct gtt gct tat aaa gag ggt ttt gtg gac	310
Gly Ser Gly Ser Arg Thr Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val Asp	
50 55 60 65	
gag gag gat ttt atc aaa gct ggt ggt tct gag ctt ttg ttt gtc caa	358
Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln	
70 75 80	
atg cag caa aca aag tct atg gag aaa cag gcc aag ctc gcc gat aag	406
Met Gln Gln Thr Lys Ser Met Glu Lys Gln Ala Lys Leu Ala Asp Lys	
85 90 95	
ttg cca cca ata cct ttc gga gaa tct gtg atg gac ttg gtt gta ata	454
Leu Pro Pro Ile Pro Phe Gly Glu Ser Val Met Asp Leu Val Val Ile	
100 105 110	
ggt tgt gga cct gct ggt ctt tca ctg gct gca gaa gct gct aag cta	502
Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys Leu	
115 120 125	
ggc ttg aaa gtt ggc ctt att ggt cct gat ctt cct ttt aca aat aat	550
Gly Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn	
130 135 140 145	
tat ggt gtg tgg gaa gac gag ttc aaa gat ctt gga ctt gaa cgt tgt	598
Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Arg Cys	
150 155 160	
atc gag cat gct tgg aag gac acc atc gta tat ctt gac aat gat gct	646
Ile Glu His Ala Trp Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asn Asp Ala	
165 170 175	
cct gtc ctt att ggt cgt gca tat gga cga gtt agc cgg cat ttg ctg	694
Pro Val Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu	
180 185 190	
cat gaa gag ttg ctg aaa agg tgt gtc gag tca ggt gta tca tat ctg	742
His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu	
195 200 205	
aat tct aaa gtg gaa agg atc act gaa gct ggt gat ggc cat agt ctt	790
Asn Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu	
210 215 220 225	
gta gtt tgt gaa aac gac atc ttt atc cct tgc agg ctt gct act gtt	838
Val Val Cys Glu Asn Asp Ile Phe Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val	
230 235 240	
gca tct gga gca gct tca ggg aaa ctt ttg gag tat gaa gta ggt ggc	886
Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly	
245 250 255	
cct cgt gtt tgt gtc caa act gct tat ggt gtg gag gtt gag gtg gag	934
Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu	
260 265 270	
aac aat cca tac gat ccc aac tta atg gta ttt atg gac tac aga gac	982
Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Asn Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp	
275 280 285	
tat atg caa cag aaa tta cag tgc tcg gaa gaa gaa tat cca aca ttt	1030
Tyr Met Gln Gln Lys Leu Gln Cys Ser Glu Glu Glu Tyr Pro Thr Phe	
290 295 300 305	

ctc tat gtc atg ccc atg tcg cca aca aga ctt ttt ttt gag gaa acc 1078  
 Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Leu Phe Phe Glu Glu Thr  
 310 315 320  
 tgt ttg gcc tca aaa gat gcc atg cct ttc gat cta ctg aag aga aaa 1126  
 Cys Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Arg Lys  
 325 330 335  
 cta atg tca cga ttg aag act ctg ggt atc caa gtt aca aaa att tat 1174  
 Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Val Thr Lys Ile Tyr  
 340 345 350  
 gaa gag gaa tgg tct tat att cct gtt ggg ggt tct tta cca aac aca 1222  
 Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr  
 355 360 365  
 gag caa aag aac cta gca ttt ggt gct gca gca agc atg gtg cat cca 1270  
 Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro  
 370 375 380 385  
 gca aca ggc tat tcg gtt gta cga tca cta tca gaa gct cca aaa tat 1318  
 Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr  
 390 395 400  
 gct tct gta att gca aag att ttg aag caa gat aac tct gca tat gtg 1366  
 Ala Ser Val Ile Ala Lys Ile Leu Lys Gln Asp Asn Ser Ala Tyr Val  
 405 410 415  
 gtt tct gga caa agc agt gca gta aac att tca atg caa gca tgg agc 1414  
 Val Ser Gly Gln Ser Ser Ala Val Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp Ser  
 420 425 430  
 agt ctt tgg cca aag gag cga aaa cgt caa aga gca ttc ttt ctt ttc 1462  
 Ser Leu Trp Pro Lys Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe  
 435 440 445  
 ggg tta gag ctt att gtg cag cta gat att gaa gca acc aga acg ttc 1510  
 Gly Leu Glu Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu Ala Thr Arg Thr Phe  
 450 455 460 465  
 ttt aga acc ttc ttc cgc ttg cca act tgg atg tgg tgg ggt ttc ctt 1558  
 Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu  
 470 475 480  
 ggg tct tca cta tca tct ttc gat ctt gta ttg ttt tcc atg tac atg 1606  
 Gly Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr Met  
 485 490 495  
 ttt gtt ttg gcc ccg aac agc atg agg atg tca ctt gtg aga cat ttg 1654  
 Phe Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His Leu  
 500 505 510  
 ctt tca gat cct tct ggt gca gtt atg gtt aaa gct tac ctc gaa agg 1702  
 Leu Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Lys Ala Tyr Leu Glu Arg  
 515 520 525  
 taatctgttt tatgaaacta tagtgtctca ttaaataaat gaggatcctt cgtatatgta 1762  
 tatgatcatc tctatgtata tcctatatc taatctcata aagtaatcga aaattcattg 1822  
 atagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1848  
 <210> 26  
 <211> 529  
 <212> PRT  
 <213> Adonis palaestina  
 <400> 26  
 Met Glu Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp  
 1 5 10 15

Thr Phe Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile  
 20 25 30  
 His Arg Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp  
 35 40 45  
 Gly Gly Ser Gly Ser Arg Thr Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val  
 50 55 60  
 Asp Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val  
 65 70 75 80  
 Gln Met Gln Gln Thr Lys Ser Met Glu Lys Gln Ala Lys Leu Ala Asp  
 85 90 95  
 Lys Leu Pro Pro Ile Pro Phe Gly Glu Ser Val Met Asp Leu Val Val  
 100 105 110  
 Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn  
 130 135 140  
 Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Glu His Ala Trp Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asn Asp  
 165 170 175  
 Ala Pro Val Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu  
 180 185 190  
 Leu His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr  
 195 200 205  
 Leu Asn Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gly His Ser  
 210 215 220  
 Leu Val Val Cys Glu Asn Asp Ile Phe Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val  
 260 265 270  
 Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Asn Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg  
 275 280 285  
 Asp Tyr Met Gln Gln Lys Leu Gln Cys Ser Glu Glu Glu Tyr Pro Thr  
 290 295 300  
 Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Leu Phe Phe Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Arg  
 325 330 335  
 Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Val Thr Lys Ile  
 340 345 350  
 Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn  
 355 360 365  
 Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His  
 370 375 380  
 Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys  
 385 390 395 400

Tyr Ala Ser Val Ile Ala Lys Ile Leu Lys Gln Asp Asn Ser Ala Tyr  
 405 410 415  
 Val Val Ser Gly Gln Ser Ser Ala Val Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp  
 420 425 430  
 Ser Ser Leu Trp Pro Lys Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu  
 435 440 445  
 Phe Gly Leu Glu Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu Ala Thr Arg Thr  
 450 455 460  
 Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr  
 485 490 495  
 Met Phe Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His  
 500 505 510  
 Leu Leu Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Lys Ala Tyr Leu Glu  
 515 520 525  
 Arg

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 1898

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Adonis palaestina

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (113)..(1699)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 27

aaaggagtgt tctattaatg ttactgtcgc attcttgcaa cacttatatt caaactccat 60  
 tttcttcttt tctcttcaaa acaacaaact aatgtgagca gagtatctgg ct atg gaa 118  
 Met Glu  
 1

cta ctt ggt gtt cgc aac ctc atc tct tct tgc cct gtg tgg act ttt 166  
 Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp Thr Phe  
 5 10 15

gga aca aga aac ctt agt agt tca aaa cta gct tat aac ata cat cga 214  
 Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile His Arg  
 20 25 30

tat ggt tct tct tgt aga gta gat ttt caa gtg aga gct gat ggt gga 262  
 Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp Gly Gly  
 35 40 45 50

agc ggg agt aga agt tct gtt gct tat aaa gag ggt ttt gtg gat gaa 310  
 Ser Gly Ser Arg Ser Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val Asp Glu  
 55 60 65

gag gat ttt atc aaa gct ggt ggt tct gag ctt ttg ttt gtc caa atg 358  
 Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met  
 70 75 80

cag caa aca aag tct atg gag aaa cag gcc aag ctc gcc gat aag ttg 406  
 Gln Gln Thr Lys Ser Met Glu Lys Gln Ala Lys Leu Ala Asp Lys Leu  
 85 90 95

## 30

cca cca ata cct ttt gga gaa tcc gtg atg gac ttg gtt gta ata ggt	454
Pro Pro Ile Pro Phe Gly Glu Ser Val Met Asp Leu Val Val Ile Gly	
100 105 110	
tgt gga cct gct ggt ctt tca ctg gct gca gaa gct gct aag cta ggg	502
Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys Leu Gly	
115 120 125 130	
ttg aaa gtt ggc ctt att ggt cct gat ctt cct ttt aca aat aat tat	550
Leu Lys Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr	
135 140 145	
ggg gtg tgg gaa gac gag ttc aaa gat ctt gga ctt gaa cgt tgt atc	598
Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Glu Arg Cys Ile	
150 155 160	
gag cat gct tgg aag gac acc atc gta tat ctt gat aat gat gct cct	646
Glu His Ala Trp Lys Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asn Asp Ala Pro	
165 170 175	
gtc ctt att ggt cgt gca tat gga cga gtt agt cga cat ttg cta cat	694
Val Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His	
180 185 190	
gag gag ttg ctg aaa agg tgt gtg gag tca ggt gta tca tat ctg gat	742
Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Asp	
195 200 205 210	
tct aaa gtg gaa agg atc act gaa gct ggt gat ggc cat agc ctt gta	790
Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu Val	
215 220 225	
gtt tgt gaa aat gag atc ttt atc cct tgc agg ctt gct act gtt gca	838
Val Cys Glu Asn Glu Ile Phe Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala	
230 235 240	
tct gga gca gct tca ggg aaa ctt ttg gag tat gaa gta ggt ggc cct	886
Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro	
245 250 255	
cgt gtt tgt gtc caa acc gct tat ggg gtg gag gtt gag gtg gag aac	934
Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn	
260 265 270	
aat cca tac gat ccc aac tta atg gta ttc atg gac tac aga gac tat	982
Asn Pro Tyr Asp Pro Asn Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr	
275 280 285 290	
atg caa cag aaa tta cag tgc tcg gaa gaa gaa tat cca aca ttt ctc	1030
Met Gln Gln Lys Leu Gln Cys Ser Glu Glu Glu Tyr Pro Thr Phe Leu	
295 300 305	
tat gtc atg ccc atg tcg cca aca aga ctt ttt ttt gag gaa acc tgt	1078
Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Leu Phe Phe Glu Glu Thr Cys	
310 315 320	
ttg gcc tca aaa gat gcc atg cca ttc gat cta ctg aag aga aaa ctg	1126
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Arg Lys Leu	
325 330 335	
atg tca cga ttg aag act ctg ggt atc caa gtt aca aaa gtt tat gaa	1174
Met Ser Arg Leu Lys Thr Leu Gly Ile Gln Val Thr Lys Val Tyr Glu	
340 345 350	
gag gaa tgg tca tat att cct gtt ggt ggt tct tta cca aac aca gag	1222
Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu	
355 360 365 370	

## 31

caa aag aac cta gca ttt ggt gct gca gca agc atg gtg cat cca gca 1270  
 Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala  
 375 380 385  
 aca ggc tat tcg gtt gta cgg tca ctg tca gaa gct cca aaa tat gct 1318  
 Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr Ala  
 390 395 400  
 tct gta att gca aag att ttg aag caa gat aac tct gcg tat gtg gtt 1366  
 Ser Val Ile Ala Lys Ile Leu Lys Gln Asp Asn Ser Ala Tyr Val Val  
 405 410 415  
 tct gga caa agt agt gca gta aac att tca atg caa gca tgg agc agt 1414  
 Ser Gly Gln Ser Ser Ala Val Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp Ser Ser  
 420 425 430  
 ctt tgg cca aag gag cga aaa cgt caa aga gca ttc ttt ctt ttt gga 1462  
 Leu Trp Pro Lys Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly  
 435 440 445 450  
 tta gag ctt att gtg cag cta gat att gaa gca acc aga aca ttc ttt 1510  
 Leu Glu Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu Ala Thr Arg Thr Phe Phe  
 455 460 465  
 aga acc ttc ttc cgc ttg cca act tgg atg tgg tgg ggt ttc ctt ggg 1558  
 Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly  
 470 475 480  
 tct tca cta tca tct ttc gat ctc gtc ttg ttt tcc atg tac atg ttt 1606  
 Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr Met Phe  
 485 490 495  
 gtt ttg gcg cca aac agc atg agg atg tca ctt gtg aga cat ttg ctt 1654  
 Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His Leu Leu  
 500 505 510  
 tca gat cct tct ggt gca gtt atg gta aga gct tac ctc gaa agg 1699  
 Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Arg Ala Tyr Leu Glu Arg  
 515 520 525  
 tagtctcatc tattattaaa ctctagtgtt tcaccaaata aatgaggatc cttcgaatgt 1759  
 gtatatgatc atctctatgt atatcctgta ctctaattctc ataaagtaaa tgccggggttt 1819  
 gatattgttg tgtcaaaccg gccaatgata taaagtaaatt ttattgatac aaaagtagtt 1879  
 tttttcctta aaaaaaaaaa 1898

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 529

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adonis palaestina

&lt;400&gt; 28

Met Glu Leu Leu Gly Val Arg Asn Leu Ile Ser Ser Cys Pro Val Trp  
 1 5 10 15  
 Thr Phe Gly Thr Arg Asn Leu Ser Ser Ser Lys Leu Ala Tyr Asn Ile  
 20 25 30  
 His Arg Tyr Gly Ser Ser Cys Arg Val Asp Phe Gln Val Arg Ala Asp  
 35 40 45  
 Gly Gly Ser Gly Ser Arg Ser Ser Val Ala Tyr Lys Glu Gly Phe Val  
 50 55 60  
 Asp Glu Glu Asp Phe Ile Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val  
 65 70 75 80

## 32

Gln	Met	Gln	Gln	Thr	Lys	Ser	Met	Glu	Lys	Gln	Ala	Lys	Leu	Ala	Asp	
				85					90						95	
Lys	Leu	Pro	Pro	Ile	Pro	Phe	Gly	Glu	Ser	Val	Met	Asp	Leu	Val	Val	
			100					105					110			
Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Lys	
		115					120					125				
Leu	Gly	Leu	Lys	Val	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Thr	Asn	
	130					135					140					
Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	Glu	Arg	
145					150					155					160	
Cys	Ile	Glu	His	Ala	Trp	Lys	Asp	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Asn	Asp	
				165				170						175		
Ala	Pro	Val	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	His	Leu	
			180					185					190			
Leu	His	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Arg	Cys	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Ser	Tyr	
	195						200					205				
Leu	Asp	Ser	Lys	Val	Glu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Gly	Asp	Gly	His	Ser	
	210					215					220					
Leu	Val	Val	Cys	Glu	Asn	Glu	Ile	Phe	Ile	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr	
225					230					235					240	
Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Glu	Tyr	Glu	Val	Gly	
				245					250					255		
Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Val	
			260					265					270			
Glu	Asn	Asn	Pro	Tyr	Asp	Pro	Asn	Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	
	275						280					285				
Asp	Tyr	Met	Gln	Gln	Lys	Leu	Gln	Cys	Ser	Glu	Glu	Glu	Tyr	Pro	Thr	
	290					295					300					
Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser	Pro	Thr	Arg	Leu	Phe	Phe	Glu	Glu	
305					310					315					320	
Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Arg	
				325					330					335		
Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr	Leu	Gly	Ile	Gln	Val	Thr	Lys	Val	
		340						345					350			
Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	
	355						360					365				
Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	
	370					375					380					
Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Lys	
385					390					395					400	
Tyr	Ala	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Ile	Leu	Lys	Gln	Asp	Asn	Ser	Ala	Tyr	
				405					410					415		
Val	Val	Ser	Gly	Gln	Ser	Ser	Ala	Val	Asn	Ile	Ser	Met	Gln	Ala	Trp	
			420					425					430			
Ser	Ser	Leu	Trp	Pro	Lys	Glu	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Ala	Phe	Phe	Leu	
		435					440					445				
Phe	Gly	Leu	Glu	Leu	Ile	Val	Gln	Leu	Asp	Ile	Glu	Ala	Thr	Arg	Thr	
	450					455					460					



## 33

Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe  
 465 470 475 480  
 Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Phe Asp Leu Val Leu Phe Ser Met Tyr  
 485 490 495  
 Met Phe Val Leu Ala Pro Asn Ser Met Arg Met Ser Leu Val Arg His  
 500 505 510  
 Leu Leu Ser Asp Pro Ser Gly Ala Val Met Val Arg Ala Tyr Leu Glu  
 515 520 525

Arg

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1661

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(1501)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 29

g atg gat act ctg ttg aaa aca ccc aac aag ctc gat ttt ttc atc cct 49

Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Lys Leu Asp Phe Phe Ile Pro

1

5

10

15

cag ttt cat ggg ttt gag aga tta tgc agt aac aat cca tac cct tca 97

Gln Phe His Gly Phe Glu Arg Leu Cys Ser Asn Asn Pro Tyr Pro Ser

20

25

30

agg gtt agg ctt ggt gtg aag aaa agg gct atc aaa att gtc tct agt 145

Arg Val Arg Leu Gly Val Lys Lys Arg Ala Ile Lys Ile Val Ser Ser

35

40

45

gta gtg agt ggt agc gct gct ctt ttg gat ctt gtt cct gaa act aag 193

Val Val Ser Gly Ser Ala Ala Leu Leu Asp Leu Val Pro Glu Thr Lys

50

55

60

aag gag aat ctt gac ttt gag ctt cct ttg tac gac act tcc aag agt 241

Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Leu Tyr Asp Thr Ser Lys Ser

65

70

75

80

caa gtt gtt gat ttg gct att gtt ggt ggt ggt cct gct ggt tta gcc 289

Gln Val Val Asp Leu Ala Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala

85

90

95

gtg gct cag cag gtt tct gaa gct gga ctc tct gtt tgt tcc att gat 337

Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp

100

105

110

cct tct cct aag ctc ata tgg cct aac aat tat gga gtt tgg gtt gat 385

Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp

115

120

125

gag ttt gag gct atg gat tta cta gac tgc ctg gat acc aca tgg tct 433

Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp Ser

130

135

140

ggg gct gtt gtc tat gtc gat gaa ggt gtc aag aag gat ttg agc cgg 481

Gly Ala Val Val Tyr Val Asp Glu Gly Val Lys Lys Asp Leu Ser Arg

145

150

155

160

cct tat ggg aga gtt aac cgg aaa cag ctc aaa tcc aaa atg ctt cag	529
Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Leu Gln	
165 170 175	
aaa tgt att acc aac ggt gtt aaa ttt cat cag tct aag gtc act aat	577
Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ser Lys Val Thr Asn	
180 185 190	
gtg gtt cac gag gag gca aac tcc act gtg gtc tgc agt gac ggt gta	625
Val Val His Glu Glu Ala Asn Ser Thr Val Val Cys Ser Asp Gly Val	
195 200 205	
aag att cag gct tcc gtg gtt ctt gat gcc act ggg ttt tcc cga tgc	673
Lys Ile Gln Ala Ser Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Cys	
210 215 220	
ttg gtt cag tat gac aaa cct tac aac cct ggg tac caa gta gct tac	721
Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr	
225 230 235 240	
ggg att ata gct gaa gtt gat ggt cac cca ttc gat gta gac aaa atg	769
Gly Ile Ile Ala Glu Val Asp Gly His Pro Phe Asp Val Asp Lys Met	
245 250 255	
gtg ttc atg gat tgg aga gac aaa cat ctg gac tca tat cct gag ctg	817
Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Lys His Leu Asp Ser Tyr Pro Glu Leu	
260 265 270	
aaa gaa cgg aac agc aag atc cca acg ttc ttg tac gct atg cca ttt	865
Lys Glu Arg Asn Ser Lys Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe	
275 280 285	
tct tcc aac cga ata ttt ctt gaa gaa act tct tta gtt gct aga cct	913
Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro	
290 295 300	
ggt ctg aga atg gaa gat atc caa gaa aga atg gct gct aga ctg aaa	961
Gly Leu Arg Met Glu Asp Ile Gln Glu Arg Met Ala Ala Arg Leu Lys	
305 310 315 320	
cat ctg ggg atc aat gtg aag agg att gag gaa gac gag cgt tgt gtg	1009
His Leu Gly Ile Asn Val Lys Arg Ile Glu Glu Asp Glu Arg Cys Val	
325 330 335	
atc ccg atg ggc ggt cct tta cca gtc tta cct caa cgg gtt gtg ggg	1057
Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly	
340 345 350	
att ggt ggg aca gca gga atg gtt cat cct tca act ggt tac atg gtt	1105
Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val	
355 360 365	
gct agg act ctt gca gct gca cca ata gtt gca aat gcc att gtg aga	1153
Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val Arg	
370 375 380	
tac ctc ggt tca cca agt agt aat agc ctg aga gga gat caa ctc tct	1201
Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Ser Asn Ser Leu Arg Gly Asp Gln Leu Ser	
385 390 395 400	
gct gag gtt tgg aga gac ttg tgg cct atc gaa cgg cgt aga cag agg	1249
Ala Glu Val Trp Arg Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg	
405 410 415	
gag ttc ttc tgt ttt gga atg gat att ctg ctg aaa ctc gat tta gac	1297
Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Asp	
420 425 430	

## 35

gct act aga agg ttc ttt gat gca ttc ttt gat ctg caa cct cat tac 1345  
 Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Gln Pro His Tyr  
 435 440 445

tgg cac gga ttc ttg tct tcc agg ctg ttt ctc ccg gaa ctg ttg gtc 1393  
 Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val  
 450 455 460

ttc ggg ttg tcg ctc ttc tca cac gct tcc aat acc tca aga ttg gag 1441  
 Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480

atc atg aca aag ggg act gtt cct ctt gct aag atg atc aac aat ttg 1489  
 Ile Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Ala Lys Met Ile Asn Asn Leu  
 485 490 495

gta caa gat aga gactaaggac cagaaactta gacatataag tataatctgtt 1541  
 Val Gln Asp Arg  
 500

ctttggttct tgaccagtag tatatccgca ttgcaagtcg ttggataatt gtgtataaac 1601  
 cacagatcca taacctgaat ccttgtgaaa tcaaattgtt actactagtt cattaaaacc 1661

<210> 30  
 <211> 500  
 <212> PRT  
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 30  
 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Lys Leu Asp Phe Phe Ile Pro  
 1 5 10 15  
 Gln Phe His Gly Phe Glu Arg Leu Cys Ser Asn Asn Pro Tyr Pro Ser  
 20 25 30  
 Arg Val Arg Leu Gly Val Lys Lys Arg Ala Ile Lys Ile Val Ser Ser  
 35 40 45  
 Val Val Ser Gly Ser Ala Ala Leu Leu Asp Leu Val Pro Glu Thr Lys  
 50 55 60  
 Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Leu Tyr Asp Thr Ser Lys Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Val Val Asp Leu Ala Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala  
 85 90 95  
 Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp  
 100 105 110  
 Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp  
 115 120 125  
 Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp Ser  
 130 135 140  
 Gly Ala Val Val Tyr Val Asp Glu Gly Val Lys Lys Asp Leu Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Leu Gln  
 165 170 175  
 Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ser Lys Val Thr Asn  
 180 185 190  
 Val Val His Glu Glu Ala Asn Ser Thr Val Val Cys Ser Asp Gly Val  
 195 200 205

## 36

Lys Ile Gln Ala Ser Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Cys  
 210 215 220  
 Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr  
 225 230 235 240  
 Gly Ile Ile Ala Glu Val Asp Gly His Pro Phe Asp Val Asp Lys Met  
 245 250 255  
 Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Lys His Leu Asp Ser Tyr Pro Glu Leu  
 260 265 270  
 Lys Glu Arg Asn Ser Lys Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe  
 275 280 285  
 Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro  
 290 295 300  
 Gly Leu Arg Met Glu Asp Ile Gln Glu Arg Met Ala Ala Arg Leu Lys  
 305 310 315 320  
 His Leu Gly Ile Asn Val Lys Arg Ile Glu Glu Asp Glu Arg Cys Val  
 325 330 335  
 Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val  
 355 360 365  
 Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val Arg  
 370 375 380  
 Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Ser Asn Ser Leu Arg Gly Asp Gln Leu Ser  
 385 390 395 400  
 Ala Glu Val Trp Arg Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg  
 405 410 415  
 Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Asp  
 420 425 430  
 Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Gln Pro His Tyr  
 435 440 445  
 Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val  
 450 455 460  
 Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu  
 465 470 475 480  
 Ile Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Ala Lys Met Ile Asn Asn Leu  
 485 490 495  
 Val Gln Asp Arg  
 500

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 1550

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Citrus X paradisi

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (45)..(1355)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 31

aaataaaaaa cactggcaaa tgctctatta gtacagtgtt atta atg gac atg ttt 56

Met Asp Met Phe

1

ata cta ccg cca ata tca att ggt aat ggt att ttg gat ttg gtg gtg	104
Ile Leu Pro Pro Ile Ser Ile Gly Asn Gly Ile Leu Asp Leu Val Val	
5 10 15 20	
att ggt tgt ggc cca gct ggt ctt gct ttg gct gca gaa tca gcg aag	152
Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys	
25 30 35	
ttg gga tta aat gtt gga ctt att ggc ccg gat ctc cct ttc aca aac	200
Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn	
40 45 50	
aat tat ggt gtg tgg gaa gat gaa ttt aga gat ctt gga ctt gaa ggg	248
Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Arg Asp Leu Gly Leu Glu Gly	
55 60 65	
tgt atc gaa cat gtc tgg aga gac aca gtt gta tat att gat gaa gat	296
Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Ile Asp Glu Asp	
70 75 80	
gaa ccc atc ttg att ggt cgt gct tat gga cga gtt agt cga cat ttg	344
Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu	
85 90 95 100	
ctt cat gaa gaa tta tta aga agg tgt gtc gag tca ggt gtt tca tat	392
Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr	
105 110 115	
ctt agc tca aaa gtg gaa agc att acg gaa tct acc agt ggt cat cgt	440
Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser Ile Thr Glu Ser Thr Ser Gly His Arg	
120 125 130	
ctt gta gct tgt gaa cat gat atg att gtc ccc tgc agg ctt gct act	488
Leu Val Ala Cys Glu His Asp Met Ile Val Pro Cys Arg Leu Ala Thr	
135 140 145	
gtt gct tct gga gca gca tca ggg aag cta ttg gaa tat gag gtg ggg	536
Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly	
150 155 160	
ggg ccc aaa gtt tct gtc caa aca gct tat ggt gtg gag gtt gag gtg	584
Gly Pro Lys Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val	
165 170 175 180	
gaa aat aat cca tat gat cca agc ctt atg gtt ttc atg gac tac aga	632
Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg	
185 190 195	
gac tgt act aag caa gaa gtt cca tct ttt gaa tct gac aat cca aca	680
Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val Pro Ser Phe Glu Ser Asp Asn Pro Thr	
200 205 210	
ttt ctt tat gtc atg ccc atg tct tca aca aga gtt ttc ttt gag gaa	728
Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Ser Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu	
215 220 225	
act tgt ttg gca tcg aaa gat ggt tta cgt ttt gac ata ttg aag aaa	776
Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Gly Leu Arg Phe Asp Ile Leu Lys Lys	
230 235 240	
aag ctc atg gca agg tta gag aga ttg gga atc cag gtt ttg aaa act	824
Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu Arg Leu Gly Ile Gln Val Leu Lys Thr	
245 250 255 260	

## 38

tat gaa gag gaa tgg tca tat att cca gtt ggt ggt tcc tta cca aat 872  
 Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn  
 265 270 275  
 aca gaa caa aga aac ctc gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtg cat 920  
 Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His  
 280 285 290  
 cca gcc act ggc tac tca gta gtc aga tca ctg tca gag gct cca aac 968  
 Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn  
 295 300 305  
 tat gct tct gca att gca tat ata ttg aaa cac gat cat tcc aga ggt 1016  
 Tyr Ala Ser Ala Ile Ala Tyr Ile Leu Lys His Asp His Ser Arg Gly  
 310 315 320  
 aga ctt aca cat gaa caa agt aat gag aat atc tca atg caa gct tgg 1064  
 Arg Leu Thr His Glu Gln Ser Asn Glu Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp  
 325 330 335 340  
 aat act ctc tgg cca cag gaa agg aag cgc caa aga gct ttt ttc ctc 1112  
 Asn Thr Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu  
 345 350 355  
 ttt gga cta gca ctc att ttg caa ctg gat att gag ggc atc agg aca 1160  
 Phe Gly Leu Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Thr  
 360 365 370  
 ttc ttt cgc act ttc ttc cga tta ccc aag tgg atg tgg cac ggt ttc 1208  
 Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met Trp His Gly Phe  
 375 380 385  
 ctt ggt tct agt ctc tca tca gcc gat ctc att cta ttt gcc ttc tat 1256  
 Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Ile Leu Phe Ala Phe Tyr  
 390 395 400  
 atg ttt att ata gca cca aat gat ctg aga aag tgc ctt atc aga cat 1304  
 Met Phe Ile Ile Ala Pro Asn Asp Leu Arg Lys Cys Leu Ile Arg His  
 405 410 415 420  
 cta gtt tca gat cca act gga gca act atg gta aga aca tac ctg act 1352  
 Leu Val Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Val Arg Thr Tyr Leu Thr  
 425 430 435  
 tta tagttagttt gtattttcca tatttcagcc cttgtttggt atatttttga 1405  
 Leu  
 ttgccatacg tgacacataa tgagcttgta tatatactcc atgtatactg taaactgtta 1465  
 gtttgacaaa tgaagccctt ttttattttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1525  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1550  
 <210> 32  
 <211> 437  
 <212> PRT  
 <213> Citrus X paradisi  
 <400> 32  
 Met Asp Met Phe Ile Leu Pro Pro Ile Ser Ile Gly Asn Gly Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala  
 20 25 30  
 Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu Ile Gly Pro Asp Leu  
 35 40 45

Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Arg Asp Leu  
 50 55 60  
 Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Asp Glu Asp Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val  
 85 90 95  
 Ser Arg His Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg Arg Cys Val Glu Ser  
 100 105 110  
 Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser Ile Thr Glu Ser Thr  
 115 120 125  
 Ser Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu His Asp Met Ile Val Pro Cys  
 130 135 140  
 Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Tyr Glu Val Gly Gly Pro Lys Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val  
 165 170 175  
 Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe  
 180 185 190  
 Met Asp Tyr Arg Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val Pro Ser Phe Glu Ser  
 195 200 205  
 Asp Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Ser Thr Arg Val  
 210 215 220  
 Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp Gly Leu Arg Phe Asp  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Lys Lys Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu Arg Leu Gly Ile Gln  
 245 250 255  
 Val Leu Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly  
 260 265 270  
 Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala  
 275 280 285  
 Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser  
 290 295 300  
 Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ser Ala Ile Ala Tyr Ile Leu Lys His Asp  
 305 310 315 320  
 His Ser Arg Gly Arg Leu Thr His Glu Gln Ser Asn Glu Asn Ile Ser  
 325 330 335  
 Met Gln Ala Trp Asn Thr Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg  
 340 345 350  
 Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu  
 355 360 365  
 Gly Ile Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Lys Trp Met  
 370 375 380  
 Trp His Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Ile Leu  
 385 390 395 400  
 Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro Asn Asp Leu Arg Lys Cys  
 405 410 415  
 Leu Ile Arg His Leu Val Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Val Arg  
 420 425 430

Thr Tyr Leu Thr Leu  
435

<210> 33

<211> 1830

<212> DNA

<213> Citrus X paradisi

<220>

<221> CDS

<222> (89)..(1660)

<223> coding for epsilon-cyclase

<400> 33

```

gggttcagtt tgtcgttgag gacaggccac aaacgcaaca caagcctcat ctttaccaaa 60
tttccgtaag caacttctgg gctgaaaa atg ctc cca ttt ctc tcc tct ctg 112
                               Met Leu Pro Phe Leu Ser Ser Leu
                               1           5

ctt aat gga gtc acg gat aac cct tgt agg aaa gcc atg gat act tta 160
Leu Asn Gly Val Thr Asp Asn Pro Cys Arg Lys Ala Met Asp Thr Leu
    10           15           20

ctc aaa act cat aac aag ctt gaa ttc ttg ccc caa gtt cac ggg gct 208
Leu Lys Thr His Asn Lys Leu Glu Phe Leu Pro Gln Val His Gly Ala
    25           30           35           40

ttg gaa aaa tcc agt agt tta agc tca ttg aag att cag aac cag gag 256
Leu Glu Lys Ser Ser Ser Leu Ser Ser Leu Lys Ile Gln Asn Gln Glu
                45           50           55

ctt agg ttt ggt ctc aag aag tct cgt caa aag agg aat agg agt tgt 304
Leu Arg Phe Gly Leu Lys Lys Ser Arg Gln Lys Arg Asn Arg Ser Cys
    60           65           70

ttc att aag gct agt agt agt gct ctt ttg gag cta gtt cct gaa acc 352
Phe Ile Lys Ala Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
    75           80           85

aag aag gaa aat ctt gaa ttt gag ctt ccc atg tat gac cca tca aag 400
Lys Lys Glu Asn Leu Glu Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
    90           95          100

ggc ctt gtt gta gac cta gca gtt gtc ggt ggc ggc ccg gct ggg ctt 448
Gly Leu Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
   105           110           115           120

gct gtt gct cag caa gtt tca ggg gcg ggg ctt tcg gtt tgc tcg att 496
Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Gly Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
    125           130           135

gat cca tct ccc aaa ttg att tgg cca aat aat tat ggt gtt tgg gtg 544
Asp Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
    140           145           150

gat gaa ttt gag gcc atg gat ttg ctt gat tgc ctt gat act act tgg 592
Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp
    155           160           165

tct ggt gct gtt gtg cac att gat gat aat aca aag aag gat ctt aat 640
Ser Gly Ala Val Val His Ile Asp Asp Asn Thr Lys Lys Asp Leu Asn
    170           175           180

aga cct tat ggg aga gtt aat agg aag ttg ctg aag tcg aaa atg ctg 688
Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Leu Leu Lys Ser Lys Met Leu
    185           190           195           200

```



## 41

caa aaa tgc ata acc aat ggt gtt aag ttt cac caa gct aaa gtt att	736
Gln Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile	
205 210 215	
aag gtt att cat gaa gag tcc aaa tct ttg ttg att tgc aat gat ggt	784
Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Leu Leu Ile Cys Asn Asp Gly	
220 225 230	
gtg aca att cag gca gcc gtg gtt ctt gat gct acg ggg ttc tct agg	832
Val Thr Ile Gln Ala Ala Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg	
235 240 245	
tgt ctt gtc cag tat gat aag ccc tat aat cca ggt tac caa gtg gca	880
Cys Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala	
250 255 260	
tat gga ata cta gct gag gta gaa cag cac ccg ttt gat tta gac aag	928
Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Gln His Pro Phe Asp Leu Asp Lys	
265 270 275 280	
atg gtt ttc atg gat tgg aga gat tgc cat ctg aac aac aat tgc cag	976
Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Asn Asn Asn Ser Gln	
285 290 295	
ctc aaa gag gca aat agc aaa att cct act ttt ctt tat gcc atg ccc	1024
Leu Lys Glu Ala Asn Ser Lys Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
300 305 310	
ttt tgc tca aac agg ata ttt ctt gaa gag act tgc cta gtg gcg cgg	1072
Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg	
315 320 325	
cct gga gtg cca atg aaa gat atc cag gaa aga atg gtg gct aga tta	1120
Pro Gly Val Pro Met Lys Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu	
330 335 340	
aag cac tta ggc ata aaa gtt aaa agc att gaa gag gat gag cat tgt	1168
Lys His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys	
345 350 355 360	
gtc att ccg atg ggt ggg ccc ctt cca gtg ctt cct caa aga gtt gtt	1216
Val Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val	
365 370 375	
gga ata ggt ggt acc gct ggg atg gtg cac cct tca act ggc tat atg	1264
Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met	
380 385 390	
gtg gca agg act tta gct gcg gct cct att gtt gca aat gca atc gtt	1312
Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val	
395 400 405	
cga agc ctc agt tct gac aga agc att tca gga cac aaa ttg tct gct	1360
Arg Ser Leu Ser Ser Asp Arg Ser Ile Ser Gly His Lys Leu Ser Ala	
410 415 420	
gaa gtt tgg aaa gat ttg tgg ccc ata gaa agg aga agg caa agg gag	1408
Glu Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu	
425 430 435 440	
ttc ttc tgt ttt ggt atg gat atc ctg ctc aaa ctt gac tta cct gcc	1456
Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala	
445 450 455	
act agg agg ttt ttc gat gct ttt ttt gat ctg gag cct cgt tat tgg	1504
Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp	
460 465 470	

cat ggt ttc tta tca tcg aga ttg ttt ctc ccc gag ctt tta gtt ttt 1552  
 His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val Phe  
 475 480 485

ggg ctt tct cta ttc tca cat gcc tct aat act tct agg cta gag atc 1600  
 Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu Ile  
 490 495 500

atg gca aag gga act ctt cct ttg gtt aac atg atc aac aac ttg gta 1648  
 Met Ala Lys Gly Thr Leu Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Val  
 505 510 515 520

caa gat aca gat taagggtgacc atgatagtta taatgtgctt aataactcat 1700  
 Gln Asp Thr Asp

gcactaatcg tttataaaac acttcaaatt agttttgatg tttatagctt attacatgaa 1760  
 ccaaagctta tgatagacgt gctttgggtat ttaagagttt cagccaaaaa aaaaaaaaaa 1820  
 aaaaaaaaaa 1830

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 524

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Citrus X paradisi

&lt;400&gt; 34

Met Leu Pro Phe Leu Ser Ser Leu Leu Asn Gly Val Thr Asp Asn Pro  
 1 5 10 15

Cys Arg Lys Ala Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr His Asn Lys Leu Glu  
 20 25 30

Phe Leu Pro Gln Val His Gly Ala Leu Glu Lys Ser Ser Ser Leu Ser  
 35 40 45

Ser Leu Lys Ile Gln Asn Gln Glu Leu Arg Phe Gly Leu Lys Lys Ser  
 50 55 60

Arg Gln Lys Arg Asn Arg Ser Cys Phe Ile Lys Ala Ser Ser Ser Ala  
 65 70 75 80

Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr Lys Lys Glu Asn Leu Glu Phe Glu  
 85 90 95

Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys Gly Leu Val Val Asp Leu Ala Val  
 100 105 110

Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Gly  
 115 120 125

Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile Asp Pro Ser Pro Lys Leu Ile Trp  
 130 135 140

Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu  
 145 150 155 160

Leu Asp Cys Leu Asp Thr Thr Trp Ser Gly Ala Val Val His Ile Asp  
 165 170 175

Asp Asn Thr Lys Lys Asp Leu Asn Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg  
 180 185 190

Lys Leu Leu Lys Ser Lys Met Leu Gln Lys Cys Ile Thr Asn Gly Val  
 195 200 205

Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys  
 210 215 220

Ser Leu Leu Ile Cys Asn Asp Gly Val Thr Ile Gln Ala Ala Val Val  
 225 230 235 240

## 43

Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg Cys Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro  
 245 250 255  
 Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu  
 260 265 270  
 Gln His Pro Phe Asp Leu Asp Lys Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp  
 275 280 285  
 Ser His Leu Asn Asn Asn Ser Gln Leu Lys Glu Ala Asn Ser Lys Ile  
 290 295 300  
 Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg Pro Gly Val Pro Met Lys Asp Ile  
 325 330 335  
 Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu Lys His Leu Gly Ile Lys Val Lys  
 340 345 350  
 Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Val Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu  
 355 360 365  
 Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met  
 370 375 380  
 Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Ile Val Ala Asn Ala Ile Val Arg Ser Leu Ser Ser Asp Arg Ser  
 405 410 415  
 Ile Ser Gly His Lys Leu Ser Ala Glu Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro  
 420 425 430  
 Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile  
 435 440 445  
 Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe  
 450 455 460  
 Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu  
 465 470 475 480  
 Phe Leu Pro Glu Leu Leu Val Phe Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala  
 485 490 495  
 Ser Asn Thr Ser Arg Leu Glu Ile Met Ala Lys Gly Thr Leu Pro Leu  
 500 505 510  
 Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Val Gln Asp Thr Asp  
 515 520

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 787

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Citrus sinensis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(787)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 35

t ctt gct ttg gct gca gaa tca gcg aag ttg gga tta aat gtt gga ctt 49  
 Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu  
 1 5 10 15

## 44

att ggc ccg gat ctc cct ttc aca aac aat tat ggt gtg tgg gaa gat	97
Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp	
20 25 30	
gaa ttt aga gat ctt gga ctt gaa ggg tgt atc gaa caa gtc tgg aga	145
Glu Phe Arg Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu Gln Val Trp Arg	
35 40 45	
gac aca gtt gta tat att gat gaa gat gaa ccc atc ttg att ggt cgt	193
Asp Thr Val Val Tyr Ile Asp Glu Asp Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg	
50 55 60	
gct tat gga cga gtt agt cga cat ttg ctt cat gaa gaa tta tta aga	241
Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg	
65 70 75 80	
agg tgt gtc gag tca ggt gta tca tat ctt agc tca aaa gtg gaa agc	289
Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser	
85 90 95	
att acg gaa tct acc agt ggt cat cgt ctt gta gct tgt gaa cat gat	337
Ile Thr Glu Ser Thr Ser Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu His Asp	
100 105 110	
atg att gtc ccc tgc agg ctt gct act gtt gct tct gga gca gca tca	385
Met Ile Val Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser	
115 120 125	
ggg aag cta ttg gaa tat ggg gtg ggg ggt ccc aaa gtt tct gtc caa	433
Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Gly Val Gly Gly Pro Lys Val Ser Val Gln	
130 135 140	
aca gct tat ggt gtg gag gtt gag gtg gaa aat aat cca tat gat cca	481
Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro	
145 150 155 160	
agc ctt atg gtt ttc atg gac tac aga gac tgt act aag caa gaa gtt	529
Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Cys Thr Lys Gln Glu Val	
165 170 175	
cca tct ttt gaa tct gac aat cca aca ttt ctt tat gtc atg ccc atg	577
Pro Ser Phe Glu Ser Asp Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met	
180 185 190	
tct tca aca aga gtt ttc ttt gag gaa act tgt ttg gca tgc aaa gat	625
Ser Ser Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp	
195 200 205	
ggc tta cgt ttt gac ata ttg aag aaa aag ctc atg gca agg tta gag	673
Gly Leu Arg Phe Asp Ile Leu Lys Lys Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu	
210 215 220	
aga ttg gga atc cag gtt ttg aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat	721
Arg Leu Gly Ile Gln Val Leu Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr	
225 230 235 240	
att cca gtt ggt ggt tcc tta cca aat aca gaa caa aga aac ctc gca	769
Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala	
245 250 255	
tat ggt gct gct gct agc	787
Tyr Gly Ala Ala Ala Ser	
260	

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Citrus sinensis

&lt;400&gt; 36

```

Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Gly Leu
 1              5              10              15
Ile Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp
      20              25              30
Glu Phe Arg Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu Gln Val Trp Arg
      35              40              45
Asp Thr Val Val Tyr Ile Asp Glu Asp Glu Pro Ile Leu Ile Gly Arg
      50              55              60
Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Arg
      65              70              75              80
Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Ser
      85              90              95
Ile Thr Glu Ser Thr Ser Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu His Asp
      100             105             110
Met Ile Val Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser
      115             120             125
Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Gly Val Gly Gly Pro Lys Val Ser Val Gln
      130             135             140
Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Asn Pro Tyr Asp Pro
      145             150             155             160
Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Cys Thr Lys Gln Glu Val
      165             170             175
Pro Ser Phe Glu Ser Asp Asn Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met
      180             185             190
Ser Ser Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Asp
      195             200             205
Gly Leu Arg Phe Asp Ile Leu Lys Lys Lys Leu Met Ala Arg Leu Glu
      210             215             220
Arg Leu Gly Ile Gln Val Leu Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr
      225             230             235             240
Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala
      245             250             255
Tyr Gly Ala Ala Ala Ser
      260

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 2357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Spinacia oleracea

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (264)..(1814)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase

&lt;400&gt; 37

gcacgagaca ccacaaaacc attgaggaga gagaaagtca accaaatttc acaccttcca 60

```

cctccctctt ccatggccgc aacccaaacc cagccacctt caccgccgcc gtcgacagca 120
cactgaactt caccactaca aacttaaaaa aaatcttgga gaaatttgat tccgtaaaaa 180
tggagtatta ttgtctcgga gcttcgaaat tcgcaacaat ggcggtttct cctgcgctta 240
atcacgacaa tttgaggaat aaa atg gtt aaa caa cgc cag aat ttc cag acg 293
          Met Val Lys Gln Arg Gln Asn Phe Gln Thr
                1             5             10

ttt tgc ttt tgg agg ccg aat tct tcg aac gtt gta gta gaa tgt agt 341
Phe Cys Phe Trp Arg Pro Asn Ser Ser Asn Val Val Val Glu Cys Ser
                15             20             25

agt cgt agg agt gga agt agt gtt ttg agg agt gcg aat agc gac agt 389
Ser Arg Arg Ser Gly Ser Ser Val Leu Arg Ser Ala Asn Ser Asp Ser
                30             35             40

agt tgc gta att gcg cca gag gat ttt gcg aac gaa gaa gat ttc atc 437
Ser Cys Val Ile Ala Pro Glu Asp Phe Ala Asn Glu Glu Asp Phe Ile
                45             50             55

aaa gct ggt ggt tcc gag ctt ctt tat gtt caa atg cag cag aat aaa 485
Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Tyr Val Gln Met Gln Gln Asn Lys
                60             65             70

gct atg gat tgt tac tcc aaa att tcc gat aag ctg cgt caa ata tca 533
Ala Met Asp Cys Tyr Ser Lys Ile Ser Asp Lys Leu Arg Gln Ile Ser
                75             80             85

gat gcc aat gaa ctg ctg gat atg gtg gtt att ggt tgt ggt cca gct 581
Asp Ala Asn Glu Leu Leu Asp Met Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala
                95             100             105

ggg cta gct ttg gct gca gaa tcg gct aaa ctt gga tta aaa gtt ggc 629
Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Lys Val Gly
                110             115             120

ctt gtt ggt cct gat ctt cct ttt acg aat aac tac ggc gtt tgg gaa 677
Leu Val Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu
                125             130             135

gat gaa ttc aga gca ttg gga ctt gga ggc tgt atc gag cac gtt tgg 725
Asp Glu Phe Arg Ala Leu Gly Leu Gly Gly Cys Ile Glu His Val Trp
                140             145             150

cgt gat acc att gtg tat att gat gat gac aat cct ata tat att ggt 773
Arg Asp Thr Ile Val Tyr Ile Asp Asp Asp Asn Pro Ile Tyr Ile Gly
                155             160             165             170

cga tct tat gga aaa gtc agc cgg caa tta ctt cac aag gaa ctg gtg 821
Arg Ser Tyr Gly Lys Val Ser Arg Gln Leu Leu His Lys Glu Leu Val
                175             180             185

cac agg tgt ttg gag tca ggt gtc tct tat ctg aat gcg aaa gtg gaa 869
His Arg Cys Leu Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Asn Ala Lys Val Glu
                190             195             200

aat att atg gaa gga cct gat gga cat agg ctt gtt gct tgt gaa cgt 917
Asn Ile Met Glu Gly Pro Asp Gly His Arg Leu Val Ala Cys Glu Arg
                205             210             215

ggg gtc act att ccc tgc agg ctt gta act gtt gca tct gga gca gct 965
Gly Val Thr Ile Pro Cys Arg Leu Val Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala
                220             225             230

tca ggg aaa ctt ctg gag tat gaa gtg ggt ggt cca agg gtt tgt gta 1013
Ser Gly Lys Leu Leu Glu Tyr Glu Val Gly Gly Pro Arg Val Cys Val
                235             240             245             250

```

## 47

caa aca gct tat ggt gtg gag gtg gag gtg gaa aac agt cct tat gat	1061
Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu Asn Ser Pro Tyr Asp	
255 260 265	
ccc aat gtg atg gtg ttc atg gac tac aga gac tac act aaa ctg agc	1109
Pro Asn Val Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys Leu Ser	
270 275 280	
gtt caa tct ctg gag gca aag tat cca aca ttc ttg tat gca atg ccg	1157
Val Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro	
285 290 295	
ata tca cca act agg atc ttc ttt gag gag act tgc ttg gct tca gta	1205
Ile Ser Pro Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Val	
300 305 310	
gat gca atg ccc ttt gac ctg ctc aag aaa aag ctt atg aca aga tta	1253
Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met Thr Arg Leu	
315 320 325 330	
caa act atg ggt gtt cgt atc acc aaa ata tat gaa gag gag tgg tct	1301
Gln Thr Met Gly Val Arg Ile Thr Lys Ile Tyr Glu Glu Glu Trp Ser	
335 340 345	
tat ata cct gtt ggt ggg tcc tta cca aat aca gag caa aga aac ctt	1349
Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu	
350 355 360	
gca ttt ggt gct gct gcg agc atg gtg cat cca gcc aca ggt tat tca	1397
Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser	
365 370 375	
gtc gtg aga tca ctg tca gaa gct cca aag tat gct tct gca att gca	1445
Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Tyr Ala Ser Ala Ile Ala	
380 385 390	
aac ttg atc aag aat gac ctg tca aaa aat gca ata ttg cgt cag agg	1493
Asn Leu Ile Lys Asn Asp Leu Ser Lys Asn Ala Ile Leu Arg Gln Arg	
395 400 405 410	
agt gtg ggg aat atc tca atg caa gcc tgg aat act ctt tgg cca caa	1541
Ser Val Gly Asn Ile Ser Met Gln Ala Trp Asn Thr Leu Trp Pro Gln	
415 420 425	
gaa agg aaa cgt cag aga gca ttc ttc ctg ttc gga cta tca ctt ata	1589
Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser Leu Ile	
430 435 440	
gtc cag ctt gat att gag ggt atc agg aca ttc ttc cgc acc ttc ttc	1637
Val Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe	
445 450 455	
cga gtg cca aaa tgg atg tgg gag gga ttc ctc ggt tct aat ctc tct	1685
Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Glu Gly Phe Leu Gly Ser Asn Leu Ser	
460 465 470	
tca gct gat ctc ata ttg ttt gcc ttt tat atg ttc ttt att gct ccg	1733
Ser Ala Asp Leu Ile Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Phe Ile Ala Pro	
475 480 485 490	
aat gac ttg aga atg ggt ctt ata agg cat cta cta tct gat cct aca	1781
Asn Asp Leu Arg Met Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr	
495 500 505	
ggg gcg acc atg ata aga acg tac ata aca cta taaaagtaat atgaaatgct	1834
Gly Ala Thr Met Ile Arg Thr Tyr Ile Thr Leu	
510 515	

Met	Val	Lys	Gln	Arg	Gln	Asn	Phe	Gln	Thr	Phe	Cys	Phe	Trp	Arg	Pro
1				5					10					15	
Asn	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Val	Glu	Cys	Ser	Ser	Arg	Arg	Ser	Gly	Ser
			20					25					30		
Ser	Val	Leu	Arg	Ser	Ala	Asn	Ser	Asp	Ser	Ser	Cys	Val	Ile	Ala	Pro
		35					40					45			
Glu	Asp	Phe	Ala	Asn	Glu	Glu	Asp	Phe	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu
	50					55					60				
Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Met	Gln	Gln	Asn	Lys	Ala	Met	Asp	Cys	Tyr	Ser
65					70					75					80
Lys	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Arg	Gln	Ile	Ser	Asp	Ala	Asn	Glu	Leu	Leu
				85					90					95	
Asp	Met	Val	Val	Ile	Gly	Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala
			100					105					110		
Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	Val	Gly	Leu	Val	Gly	Pro	Asp	Leu
		115					120					125			
Pro	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	Phe	Arg	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Leu	Gly	Gly	Cys	Ile	Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	Thr	Ile	Val	Tyr
145					150					155					160
Ile	Asp	Asp	Asp	Asn	Pro	Ile	Tyr	Ile	Gly	Arg	Ser	Tyr	Gly	Lys	Val
				165					170					175	
Ser	Arg	Gln	Leu	Leu	His	Lys	Glu	Leu	Val	His	Arg	Cys	Leu	Glu	Ser
			180					185					190		
Gly	Val	Ser	Tyr	Leu	Asn	Ala	Lys	Val	Glu	Asn	Ile	Met	Glu	Gly	Pro
		195					200					205			
Asp	Gly	His	Arg	Leu	Val	Ala	Cys	Glu	Arg	Gly	Val	Thr	Ile	Pro	Cys
	210					215					220				
Arg	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Glu
225					230					235					240
Tyr	Glu	Val	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val
				245					250					255	



## 49

Glu Val Glu Val Glu Asn Ser Pro Tyr Asp Pro Asn Val Met Val Phe  
                   260                                  265                                  270  
 Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys Leu Ser Val Gln Ser Leu Glu Ala  
                   275                                  280                                  285  
 Lys Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro Ile Ser Pro Thr Arg Ile  
                   290                                  295                                  300  
 Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Val Asp Ala Met Pro Phe Asp  
 305                                  310                                  315                                  320  
 Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met Thr Arg Leu Gln Thr Met Gly Val Arg  
                                   325                                  330                                  335  
 Ile Thr Lys Ile Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly  
                                   340                                  345                                  350  
 Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Arg Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala  
                   355                                  360                                  365  
 Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser  
                   370                                  375                                  380  
 Glu Ala Pro Lys Tyr Ala Ser Ala Ile Ala Asn Leu Ile Lys Asn Asp  
 385                                  390                                  395                                  400  
 Leu Ser Lys Asn Ala Ile Leu Arg Gln Arg Ser Val Gly Asn Ile Ser  
                                   405                                  410                                  415  
 Met Gln Ala Trp Asn Thr Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg  
                   420                                  425                                  430  
 Ala Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ser Leu Ile Val Gln Leu Asp Ile Glu  
                   435                                  440                                  445  
 Gly Ile Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met  
                   450                                  455                                  460  
 Trp Glu Gly Phe Leu Gly Ser Asn Leu Ser Ser Ala Asp Leu Ile Leu  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Phe Ala Phe Tyr Met Phe Phe Ile Ala Pro Asn Asp Leu Arg Met Gly  
                                   485                                  490                                  495  
 Leu Ile Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Met Ile Arg  
                   500                                  505                                  510  
 Thr Tyr Ile Thr Leu  
                   515

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 1378

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Solanum tuberosum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (2)..(1147)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 39

t agc ggn nnn nag gat gag ttc aaa gat ctt ggt ctt caa gcc tgc att 49  
 Ser Xaa Xaa Xaa Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys Ile

1

5

10

15

gaa cat gtt tgg cgg gat acc att gta tat ctt gat gat gat gat cct 97  
 Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Asp Pro

20

25

30

## 50

att ctt att ggc cgt gcc tat gga aga gtt agt cgc cat tta ctg cac	145
Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His	
35 40 45	
gag gag tta ctc aaa agg tgt gtg gag gca ggt gtt ttg tat cta aac	193
Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu Asn	
50 55 60	
tcg aaa gtg gat agg att gtt gag gcc aca aat ggc cac agt ctt gta	241
Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly His Ser Leu Val	
65 70 75 80	
gag tgc gag ggt gat gtt gtg att ccc tgc agg ttt gtg act gtt gca	289
Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val Ala	
85 90 95	
tcg gga gca gcc tcg ggg aaa ttc ttg cag tat gag ttg gga ggt cct	337
Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro	
100 105 110	
aga gtt tct gtt caa aca gct tat gga gtg gaa gtt gag gtc gat aac	385
Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp Asn	
115 120 125	
aat cca ttt gac ccg agc ctg atg gtt ttc atg gat tat aga gac tat	433
Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr	
130 135 140	
gtc aga cac gac gct caa tct tta gaa gct aaa tat cca aca ttt ctc	481
Val Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu	
145 150 155 160	
tat gcc atg ccc atg tct cca aca cga gtc ttt ttc gag gaa act tgt	529
Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys	
165 170 175	
ttg gct tca aaa gat gca atg cca ttc gat ctg tta aag aaa aaa ttg	577
Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu	
180 185 190	
atg tta cga ttg aac acc ctc ggt gta aga att aaa gaa att tat gag	625
Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr Glu	
195 200 205	
gag gaa tgg tct tac ata cca gtt gga gga tct ttg cca aat aca gaa	673
Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu	
210 215 220	
caa aaa aca ctt gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtt cat cca gcc	721
Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala	
225 230 235 240	
aca ggt tat tca gtc gtc aga tca ctg tct gaa gct cca aaa tgc gcc	769
Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys Ala	
245 250 255	
ttc gtg ctt gca aat ata tta cga caa aat cat agc aag aat atg ctt	817
Phe Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln Asn His Ser Lys Asn Met Leu	
260 265 270	
act agt tca agt acc ccg agt att tca act caa gct tgg aac act ctt	865
Thr Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr Leu	
275 280 285	
tgg cca caa gaa cga aaa cga caa aga tcg ttt ttc cta ttt gga ctg	913
Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu	
290 295 300	

## 51

gct ctg ata ttg cag ctg gat att gag ggg ata agg tca ttt ttc cgc 961  
 Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg  
 305 310 315 320  
 gcg ttc ttc cgt gtg cca aaa tgg atg tgg cag gga ttt ctt ggt tca 1009  
 Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser  
 325 330 335  
 agt ctt tct tna gca gac ctc atg tta ttt gcc ttc tac atg ttt att 1057  
 Ser Leu Ser Xaa Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile  
 340 345 350  
 att gca cca aat gac atg aga aga ggc tta atc aga cat ctt tta tct 1105  
 Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Arg Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser  
 355 360 365  
 gat cct act ggt gca aca ttg ata aga act tat ctt aca ttt 1147  
 Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
 370 375 380  
 tagagtaaatt tcctcctaca atagttgttg aannagagggc ctcattactt cagattcata 1207  
 acagaaatcg cggctctctcg aggccttgta tataacattt tcactagggtt aatattgctt 1267  
 gaataagttg cacagtttca gtttttgtat ctgcttcttt tttgtccaag atcatgtatt 1327  
 ganccaattt atatacattg ccagtatata taaattttat aaaaaaaaaa a 1378  
 <210> 40  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> Solanum tuberosum  
 <400> 40  
 Ser Xaa Xaa Xaa Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys Ile  
 1 5 10 15  
 Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Asp Pro  
 20 25 30  
 Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu His  
 35 40 45  
 Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu Asn  
 50 55 60  
 Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly His Ser Leu Val  
 65 70 75 80  
 Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val Ala  
 85 90 95  
 Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro  
 100 105 110  
 Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp Asn  
 115 120 125  
 Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr  
 130 135 140  
 Val Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys  
 165 170 175  
 Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu  
 180 185 190

## 52

Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr Glu  
 195 200 205

Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu  
 210 215 220

Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala  
 225 230 235 240

Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys Ala  
 245 250 255

Phe Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln Asn His Ser Lys Asn Met Leu  
 260 265 270

Thr Ser Ser Ser Thr Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr Leu  
 275 280 285

Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly Leu  
 290 295 300

Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe Arg  
 305 310 315 320

Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly Ser  
 325 330 335

Ser Leu Ser Xaa Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile  
 340 345 350

Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Arg Gly Leu Ile Arg His Leu Leu Ser  
 355 360 365

Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
 370 375 380

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 497

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Daucus carota

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(495)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 41

tat ggt gtt tgg gtg gat gaa ttt ata gat ctt gga ctt gaa ggg tgt	48
Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu Phe Ile Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys	
1 5 10 15	
att gag cat gtt tgg cgg gat act att gta tat ctt gat gat ggt gat	96
Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Gly Asp	
20 25 30	
cct att atg att ggc cgt gct tac gga aga gtt agt cgc cat ttg ctt	144
Pro Ile Met Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu	
35 40 45	
cat gaa gaa ttg ctt aaa agg tgt gtc gag tca ggt gtt tcg tat ctt	192
His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu	
50 55 60	
agc tca aaa gtt gaa aag att att gaa gct gga gat ggc cac agc ctg	240
Ser Ser Lys Val Glu Lys Ile Ile Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu	
65 70 75 80	

## 53

gtt	gag	tgt	gaa	aat	aat	att	gtc	att	cca	tgc	agg	ctt	gct	act	gtt	288
Val	Glu	Cys	Glu	Asn	Asn	Ile	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Leu	Ala	Thr	Val	
85																
gca	tct	gga	gca	gct	tct	ggg	aaa	ctt	ttg	cag	tat	gag	gtt	ggg	ggt	336
Ala	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Glu	Val	Gly	Gly	
100																
ccc	aga	gtt	tct	gtc	caa	aca	gct	tat	ggg	gtc	gag	gtt	gag	gtg	gaa	384
Pro	Arg	Val	Ser	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Val	Glu	
115																
aac	aat	cca	tat	gat	ccc	agt	cta	atg	gtt	ttc	atg	gat	tac	aga	gat	432
Asn	Asn	Pro	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	
130																
tat	acc	aaa	caa	aaa	gtt	cca	ggc	atg	gag	gca	gaa	tat	cca	act	ttc	480
Tyr	Thr	Lys	Gln	Lys	Val	Pro	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Tyr	Pro	Thr	Phe	
145																
ctg	tat	gcc	atg	cca	tt											497
Leu	Tyr	Ala	Met	Pro												
165																

<210> 42

**<211> 165**

<212> PRT

<213> Daucus carota

<400> 42

Tyr Gly Val Trp Val Asp Glu Phe Ile Asp Leu Gly Leu Glu Gly Cys  
1 5 10 15

Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Gly Asp  
20 25 30

Pro Ile Met Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Leu Leu  
35 40 45

His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu  
50 55 60

Ser Ser Lys Val Glu Lys Ile Ile Glu Ala Gly Asp Gly His Ser Leu  
65 70 75 80

Val Glu Cys Glu Asn Asn Ile Val Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val  
85 90 95

Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Val Gly Gly  
100 105 110

Pro Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Glu  
115 120 125

Asn Asn Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp  
130 135 140

Tyr Thr Lys Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe  
145 150 155 160

Leu Tyr Ala Met Pro  
165

**<210> 43**

**<211> 605**

<212> DNA

<213> Daucus carota

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)..(605)

&lt;223&gt; coding for episilon-cyclase (partial)

&lt;400&gt; 43

```

tc att ggc cgt gct tat gga aga tta gtc gcc att tgc ttc atg aag      47
  Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Leu Val Ala Ile Cys Phe Met Lys
    1             5             10             15

aat tgc tta aaa ggt gtg tcg agt cag gtg ttt cgt atc tta gct caa      95
Asn Cys Leu Lys Gly Val Ser Ser Gln Val Phe Arg Ile Leu Ala Gln
          20             25             30

aag ttg aaa aga tta ttg aag ctg gag atg gcc aca gcc tgg ttg agt     143
Lys Leu Lys Arg Leu Leu Lys Leu Glu Met Ala Thr Ala Trp Leu Ser
          35             40             45

gtg aaa ata ata ttg tca ttc cat gca ggc ttg cta ctg ttg cat ctg     191
Val Lys Ile Ile Leu Ser Phe His Ala Gly Leu Leu Leu Leu His Leu
          50             55             60

gag cag ctt ctg gga aac ttt tgc agt atg ggg ttg ggg gtc cca gag     239
Glu Gln Leu Leu Gly Asn Phe Cys Ser Met Gly Leu Gly Val Pro Glu
          65             70             75

ttt ctg tcc aaa cag ctt atg gtg tcg agg ttg agg tgg aaa cca atc     287
Phe Leu Ser Lys Gln Leu Met Val Ser Arg Leu Arg Trp Lys Pro Ile
          80             85             90             95

cca tat gat ccc agt cta atg gtt ttc atg gat tac aga gat tat acc     335
Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr
          100            105            110

aaa caa aaa gtt cca ggc atg gag gca gaa tat cca aca ttt ctt tat     383
Lys Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr
          115            120            125

gtg atg ccc atg tcc cca aca agg att ttc ttt gag gag aca tgt ttg     431
Val Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu
          130            135            140

gct tca aaa gat gcg atg cca ttc gat cta ctg aag aaa aaa ctc atg     479
Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met
          145            150            155

tca aga tta cag acg atg gga att cga gtt gcc aag aca tat gaa gag     527
Ser Arg Leu Gln Thr Met Gly Ile Arg Val Ala Lys Thr Tyr Glu Glu
          160            165            170            175

gaa tgg tct tat ata cct gtt ggg gga tct tta cct aat act gag caa     575
Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln
          180            185            190

aag aat ctc gcc ttt ggt gct gcc gct aga                             605
Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Arg
          195            200

```

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 201

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Daucus carota

&lt;400&gt; 44

```

Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Leu Val Ala Ile Cys Phe Met Lys Asn
  1             5             10             15

```

## 55

Cys Leu Lys Gly Val Ser Ser Gln Val Phe Arg Ile Leu Ala Gln Lys  
                   20                  25                  30  
 Leu Lys Arg Leu Leu Lys Leu Glu Met Ala Thr Ala Trp Leu Ser Val  
                   35                  40                  45  
 Lys Ile Ile Leu Ser Phe His Ala Gly Leu Leu Leu Leu His Leu Glu  
           50                  55                  60  
 Gln Leu Leu Gly Asn Phe Cys Ser Met Gly Leu Gly Val Pro Glu Phe  
   65                  70                  75                  80  
 Leu Ser Lys Gln Leu Met Val Ser Arg Leu Arg Trp Lys Pro Ile Pro  
                   85                  90                  95  
 Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys  
                  100                 105                 110  
 Gln Lys Val Pro Gly Met Glu Ala Glu Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val  
          115                 120                 125  
 Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Ile Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala  
  130                 135                 140  
 Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys Leu Met Ser  
 145                 150                 155                 160  
 Arg Leu Gln Thr Met Gly Ile Arg Val Ala Lys Thr Tyr Glu Glu Glu  
                  165                 170                 175  
 Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys  
                  180                 185                 190  
 Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Arg  
          195                 200

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 1697

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Lycopersicon esculentum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (6)..(1583)

&lt;223&gt; coding for epsilon-cyclase

&lt;400&gt; 45

ttgaa atg gag tgt gtt gga gtt caa aat gtt gga gca atg gca gtt tta 50  
   Met Glu Cys Val Gly Val Gln Asn Val Gly Ala Met Ala Val Leu  
           1                  5                  10                  15  
 acg cgt ccg aga ttg aac cgt tgg tcg gga gga gag tta tgc caa gaa 98  
 Thr Arg Pro Arg Leu Asn Arg Trp Ser Gly Gly Glu Leu Cys Gln Glu  
                   20                  25                  30  
 aaa agc atc ttt ttg gcg tat gag cag tat gaa agt aaa tgt aat agc 146  
 Lys Ser Ile Phe Leu Ala Tyr Glu Gln Tyr Glu Ser Lys Cys Asn Ser  
                   35                  40                  45  
 agt agt ggt agt gac agt tgt gta gtt gat aaa gaa gat ttt gct gat 194  
 Ser Ser Gly Ser Asp Ser Cys Val Val Asp Lys Glu Asp Phe Ala Asp  
                   50                  55                  60  
 gaa gaa gat tat ata aaa gcc ggt ggt tcg caa ctt gta ttt gtt caa 242  
 Glu Glu Asp Tyr Ile Lys Ala Gly Gly Ser Gln Leu Val Phe Val Gln  
           65                  70                  75

## 56

atg cag cag aaa aaa gat atg gat cag cag tct aag ctt tct gat gag	290
Met Gln Gln Lys Lys Asp Met Asp Gln Gln Ser Lys Leu Ser Asp Glu	
80 85 90 95	
tta cga caa ata tct gct gga caa acc gta ctg gat tta gtg gta atc	338
Leu Arg Gln Ile Ser Ala Gly Gln Thr Val Leu Asp Leu Val Val Ile	
100 105 110	
ggc tgt ggt cct gct ggt ctt gct ctt gcc gcg gag tca gct aaa ttg	386
Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ser Ala Lys Leu	
115 120 125	
ggg ttg aac gtg ggg ctc gtt ggg cct gat ctt cct ttc aca aac aac	434
Gly Leu Asn Val Gly Leu Val Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn	
130 135 140	
tat ggt gta tgg gag gac gag ttc aaa gat ctt ggt ctt caa gcc tgc	482
Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Lys Asp Leu Gly Leu Gln Ala Cys	
145 150 155	
att gaa cat gtt tgg cgg gat acc att gta tat ctt gat gat gat gaa	530
Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Ile Val Tyr Leu Asp Asp Asp Glu	
160 165 170 175	
cct att ctt att ggc cgt gcc tat gga aga gtt agt cgc cat ttt ctg	578
Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser Arg His Phe Leu	
180 185 190	
cac gag gag tta ctc aaa agg tgt gtg gag gca ggt gtt ttg tat cta	626
His Glu Glu Leu Leu Lys Arg Cys Val Glu Ala Gly Val Leu Tyr Leu	
195 200 205	
aac tcg aaa gtg gat agg att gtt gag gcc aca aat ggc cag agt ctt	674
Asn Ser Lys Val Asp Arg Ile Val Glu Ala Thr Asn Gly Gln Ser Leu	
210 215 220	
gta gag tgc gaa ggt gat gtt gtg att ccc tgc agg ttt gtg act gtt	722
Val Glu Cys Glu Gly Asp Val Val Ile Pro Cys Arg Phe Val Thr Val	
225 230 235	
gca tcg ggg gca gcc tcg ggg aaa ttc ttg cag tat gag ttg gga agt	770
Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Phe Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Ser	
240 245 250 255	
cct aga gtt tct gtt caa aca gct tat gga gtg gaa gtt gag gtt gat	818
Pro Arg Val Ser Val Gln Thr Ala Tyr Gly Val Glu Val Glu Val Asp	
260 265 270	
aac aat cca ttt gac ccg agc ctg atg gtt ttc atg gat tat aga gat	866
Asn Asn Pro Phe Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp	
275 280 285	
tat ctc aga cac gac gct caa tct tta gaa gct aaa tat cca aca ttt	914
Tyr Leu Arg His Asp Ala Gln Ser Leu Glu Ala Lys Tyr Pro Thr Phe	
290 295 300	
ctt tat gcc atg ccc atg tct cca aca cga gtc ttt ttc gag gaa act	962
Leu Tyr Ala Met Pro Met Ser Pro Thr Arg Val Phe Phe Glu Glu Thr	
305 310 315	
tgt ttg gct tca aaa gat gca atg cca ttc gat ctg tta aag aaa aaa	1010
Cys Leu Ala Ser Lys Asp Ala Met Pro Phe Asp Leu Leu Lys Lys Lys	
320 325 330 335	
ctg atg cta cga ttg aac acc ctt ggt gta aga att aaa gaa att tac	1058
Leu Met Leu Arg Leu Asn Thr Leu Gly Val Arg Ile Lys Glu Ile Tyr	
340 345 350	



## 57

gag gag gaa tgg tct tac ata ccg gtt ggt gga tct ttg cca aat aca 1106  
 Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr  
 355 360 365

gaa caa aaa aca ctt gca ttt ggt gct gct gct agc atg gtt cat cca 1154  
 Glu Gln Lys Thr Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro  
 370 375 380

gcc aca ggt tat tca gtc gtc aga tca ctt tct gaa gct cca aaa tgc 1202  
 Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Lys Cys  
 385 390 395

gcc tct gta ctt gca aat ata tta cga caa cat tat agc aag aac atg 1250  
 Ala Ser Val Leu Ala Asn Ile Leu Arg Gln His Tyr Ser Lys Asn Met  
 400 405 410 415

ctt acc agt tca agt atc ccg agt ata tca act caa gct tgg aac act 1298  
 Leu Thr Ser Ser Ser Ile Pro Ser Ile Ser Thr Gln Ala Trp Asn Thr  
 420 425 430

ctt tgg cca caa gaa cga aaa cga caa aga tcg ttt ttc cta ttt gga 1346  
 Leu Trp Pro Gln Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ser Phe Phe Leu Phe Gly  
 435 440 445

ctg gct ctg ata ttg cag ctg gat att gag ggg ata agg tca ttt ttc 1394  
 Leu Ala Leu Ile Leu Gln Leu Asp Ile Glu Gly Ile Arg Ser Phe Phe  
 450 455 460

cgc gca ttc ttc cgt gtg cca aaa tgg atg tgg cag gga ttt ctt ggt 1442  
 Arg Ala Phe Phe Arg Val Pro Lys Trp Met Trp Gln Gly Phe Leu Gly  
 465 470 475

tca agt ctt tct tca gca gac ctg atg tta ttt gcc ttc tac atg ttt 1490  
 Ser Ser Leu Ser Ser Ala Asp Leu Met Leu Phe Ala Phe Tyr Met Phe  
 480 485 490 495

att att gca cca aat gac atg aga aaa ggc ttg atc aga cat ctt tta 1538  
 Ile Ile Ala Pro Asn Asp Met Arg Lys Gly Leu Ile Arg His Leu Leu  
 500 505 510

tct gat cct act ggt gca aca ttg ata aga act tat ctt aca ttt 1583  
 Ser Asp Pro Thr Gly Ala Thr Leu Ile Arg Thr Tyr Leu Thr Phe  
 515 520 525

tagagtaaac tctctctaca ataattgttg aatcagaggc ctcattactt cagattcata 1643  
 acagaaatcg cggctctctcg aggcattgta tataacattt tcactagctt aata 1697

<210> 46  
 <211> 526  
 <212> PRT  
 <213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 46  
 Met Glu Cys Val Gly Val Gln Asn Val Gly Ala Met Ala Val Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Arg Leu Asn Arg Trp Ser Gly Gly Glu Leu Cys Gln Glu Lys  
 20 25 30  
 Ser Ile Phe Leu Ala Tyr Glu Gln Tyr Glu Ser Lys Cys Asn Ser Ser  
 35 40 45  
 Ser Gly Ser Asp Ser Cys Val Val Asp Lys Glu Asp Phe Ala Asp Glu  
 50 55 60  
 Glu Asp Tyr Ile Lys Ala Gly Gly Ser Gln Leu Val Phe Val Gln Met  
 65 70 75 80

## 58

Gln	Gln	Lys	Lys	Asp	Met	Asp	Gln	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Asp	Glu	Leu	85	90	95
Arg	Gln	Ile	Ser	Ala	Gly	Gln	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	Val	Val	Ile	Gly	100	105	110
Cys	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	Lys	Leu	Gly	115	120	125
Leu	Asn	Val	Gly	Leu	Val	Gly	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Thr	Asn	Asn	Tyr	130	135	140
Gly	Val	Trp	Glu	Asp	Glu	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	Gln	Ala	Cys	Ile	145	150	155
Glu	His	Val	Trp	Arg	Asp	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Asp	Asp	Glu	Pro	165	170	175
Ile	Leu	Ile	Gly	Arg	Ala	Tyr	Gly	Arg	Val	Ser	Arg	His	Phe	Leu	His	180	185	190
Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Arg	Cys	Val	Glu	Ala	Gly	Val	Leu	Tyr	Leu	Asn	195	200	205
Ser	Lys	Val	Asp	Arg	Ile	Val	Glu	Ala	Thr	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Val	210	215	220
Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Phe	Val	Thr	Val	Ala	225	230	235
Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gly	Ser	Pro	245	250	255
Arg	Val	Ser	Val	Gln	Thr	Ala	Tyr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Val	Asp	Asn	260	265	270
Asn	Pro	Phe	Asp	Pro	Ser	Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	Tyr	275	280	285
Leu	Arg	His	Asp	Ala	Gln	Ser	Leu	Glu	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	290	295	300
Tyr	Ala	Met	Pro	Met	Ser	Pro	Thr	Arg	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Thr	Cys	305	310	315
Leu	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Met	Pro	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Leu	325	330	335
Met	Leu	Arg	Leu	Asn	Thr	Leu	Gly	Val	Arg	Ile	Lys	Glu	Ile	Tyr	Glu	340	345	350
Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile	Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	355	360	365
Gln	Lys	Thr	Leu	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	Pro	Ala	370	375	380
Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Lys	Cys	Ala	385	390	395
Ser	Val	Leu	Ala	Asn	Ile	Leu	Arg	Gln	His	Tyr	Ser	Lys	Asn	Met	Leu	405	410	415
Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Pro	Ser	Ile	Ser	Thr	Gln	Ala	Trp	Asn	Thr	Leu	420	425	430
Trp	Pro	Gln	Glu	Arg	Lys	Arg	Gln	Arg	Ser	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	435	440	445
Ala	Leu	Ile	Leu	Gln	Leu	Asp	Ile	Glu	Gly	Ile	Arg	Ser	Phe	Phe	Arg	450	455	460

## 59

Ala	Phe	Phe	Arg	Val	Pro	Lys	Trp	Met	Trp	Gln	Gly	Phe	Leu	Gly	Ser
465					470					475					480
Ser	Leu	Ser	Ser	Ala	Asp	Leu	Met	Leu	Phe	Ala	Phe	Tyr	Met	Phe	Ile
				485					490					495	
Ile	Ala	Pro	Asn	Asp	Met	Arg	Lys	Gly	Leu	Ile	Arg	His	Leu	Leu	Ser
			500					505					510		
Asp	Pro	Thr	Gly	Ala	Thr	Leu	Ile	Arg	Thr	Tyr	Leu	Thr	Phe		
		515					520					525			

<210> 47  
 <211> 510  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(510)  
 <223> coding for epsilon-cyclase specific probe

<400> 47  
 ggcacgagggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60  
 gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120  
 agaatcatta ctaacaatca atgagtatga gagctggaca catgacggca acaatggcgg 180  
 cttttacatg ccctaggttt atgactagca tcagatacac gaagcaaatt aagtgcaacg 240  
 ctgctaaaag ccagctagtc gttaaacaag agattgagga ggaagaagat tatgtgaaag 300  
 ccggtggatc ggagctgctt tttgttcaa tgcaacagaa taagtccatg gatgcacagt 360  
 ctagcctatc ccaaaagctc ccaaggggtac caataggagg aggaggagac agtaactgta 420  
 tactggattt gggttgaatt gggtgtggtc ctgctggcct tgctcttgct ggagaatcag 480  
 ccaagctagg cttgaatgct gcacttatcg 510

<210> 48  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer

<400> 48  
 ggcacgagggc aaagcaaagg 20

<210> 49  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer

<400> 49  
 cgataagtgc gacattcaag c 21

<210> 50  
 <211> 734  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta  
 <220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(734)

<223> fragment of epsilon cyclase gene obtain by iPCR  
comprising part of promoter region

<400> 50

```
ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg 180
gagctgcttt ttgttcaa atgcaacagaat aagtcacatg atgcacagtc tagcctatcc 240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc 360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttggggaggtg ggggattata ggctttgttg 420
tgagaatgtt gagaaagagg tttgacaaat cgggtgttga atgagggtta atggaggtta 480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggatgatgg gatattaaag acggscaata 540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggttaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttg ttgttggttg tgagagacac tccaatccaa 720
acagatacaa ggcg                                     734
```

<210> 51

<211> 280

<212> DNA

<213> Tagetes erecta

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(280)

<223> fragment of epsilon cyclase gene obtain by  
TAIL-PCR comprising part of promoter region

<400> 51

```
gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat 60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaac acatacaacg 120
tggcttttaa agatggcttg gctgctaact aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaaggttgt ttgttggttg 240
tggttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280
```

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 52

cgccttgtat ctgtttggat tgg

23

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 53

ctaacaatca atgagtatga gagc

24

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
     oligonucleotide primer  
 <400> 54  
 agagcaaggc cagcaggacc acaacc 26  
 <210> 55  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
     oligonucleotide primer  
 <400> 55  
 ccttgggagc ttttgggata ggctag 26  
 <210> 56  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
     oligonucleotide primer  
 <400> 56  
 tcacgccttg tatctgtttg gattgg 26  
 <210> 57  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
     oligonucleotide primer  
 <400> 57  
 gtcgagtatg gagtt 15  
 <210> 58  
 <211> 734  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(734)  
 <223> coding for epsilon-cyclase genomic iPCR-fragment  
 <400> 58  
 ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc 60  
 cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120  
 cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cgggtggatcg 180  
 gagctgcttt ttgttcaaat gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc 240  
 caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat 300  
 gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc 360  
 gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggagggtg ggggattata ggctttgttg 420  
 tgagaatgtt gagaaagagg tttgacaaat cgggtgtttga atgaggttta atggagtta 480  
 attaaaataa agagaagaga aagattaaga ggggtgatggg gatattaaag acggscaata 540  
 tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600  
 tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660

ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttgtttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa 720  
acagatacaa ggcg 734

<210> 59

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 59

ctcgagagta aaatcggttag ttatg 25

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 60

ccatggccat tgattggttag taatgattc 29

<210> 61

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 61

ccatggtaat ttgcttcgtg tatctgatg 29

<210> 62

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 62

ccatggcgct agcagcgaca gtaatg 26

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 63

gatatccggt gtgagggaac tag 23

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 64

gcaagctcga cagctacaaa cc

22

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 65

gaagcatgca gctagcagcg acag

24

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 1795

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: coding for  
ketolase - 35S terminator construct

&lt;400&gt; 66

```

ccatggcgct agcagcgaca gtaatgttgg agcagcttac cggaagcgct gaggcactca 60
aggagaagga gaaggagggt gcaggcagct ctgacgtgtt gcgtacatgg gcgacccagt 120
actcgcttcc gtcagaggag tcagacgcgg cccgccggg actgaagaat gcctacaagc 180
caccaccttc cgacacaaag ggcatcacia tggcgctagc tgtcatcggc tcctgggccc 240
cagtgttcct ccacgccatt tttcaaatac agcttccgac ctccttggac cagctgcact 300
ggctgcccgt gtcagatgcc acagctcagc tggttagcgg cagcagcagc ctgctgcaca 360
tcgtcgtagt attctttgtc ctggagttcc tgtacacagg cctttttatc accacgcatg 420
atgctatgca tggcaccatc gccatgagaa acaggcagct taatgacttc ttgggcagag 480
tatgcatctc cttgtacgcc tggtttgatt acaacatgct gcaccgcaag cattggggagc 540
accacaacca cactggcgag gtgggcaagg accctgactt ccacagggga aaccctggca 600
ttgtgccttg gtttgccagc ttcattgtcc gctacatgtc gatgtggcag tttgcgcgcc 660
tcgatgggtg gacgggtgtc atgcagctgc tgggtgcgcc aatggcgaa cctgctggtg 720
tcattggcgc cgcgcccacc ctgtccgcct tccgcttggt ctactttggc acgtacatgc 780
cccacaagcc tgagcctggc gccgcgtcag gctcttcacc agcgtcatg aactgggtga 840
agtcgcgcac tagccaggcg tccgacctgg tcagctttct gacctgctac cacttcgacc 900
tgactgggga gcaccaccgc tggccctttg cccctggtg ggagctgccc aactgccgcc 960
gcctgtctgg ccgaggtctg gttcctgctt agctggacac actgcagtgg gccctgctgc 1020
cagctgggca tgcttcagag tcgacggatc cccgggaatt cggtagctg aaatcaccag 1080
tctctctcta caaatctatc tctctctatt ttctccataa ataatgtgtg agtagtttcc 1140
cgataaggga aattagggtt cttatagggt ttcgctcatg tgttgagcat ataagaaacc 1200
cttagtatgt atttgtatct gtaaaatact tctatcaata aaatttctaa ttcctaaaac 1260
caaaatccag tactaaaatc cagatctcct aaagtcccta tagatctttg tcgtgaatat 1320
aaaccagaca cgagacgact aaacctggag ccagacgcc gttcgaagct agaagtaccg 1380
cttaggcagg aggccgttag ggaaaagatg ctaaggcagg gttggttacg ttgactcccc 1440
cgtaggtttg gtttaaatat gatgaagtgg acggaaggaa ggaggaagac aaggaaggat 1500
aaggttgcag gccctgtgca aggtaagaag atggaaatct gatagaggta cgctactata 1560
cttatactat acgctaaggg aatgcttgta tttataccct ataccctcta ataaccctt 1620
atcaatttaa gaaataatcc gcataagccc ccgcttaaaa attggtatca gagccatgaa 1680
taggtctatg accaaaactc aagaggataa aacctacca aaatacgaaa gagttcttaa 1740
ctctaaagat aaaagatctt tcaagatcaa aactagttcc ctacaccgg atatc 1795

```

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 28

<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 67  
gagctcactc actgatttcc attgcttg 28  
<210> 68  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 68  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc 37  
<210> 69  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 69  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac 34  
<210> 70  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 70  
taagcttttt gttgaagaga tttgg 25  
<210> 71  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer  
<400> 71  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc 28  
<210> 72  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer



<400> 72  
 ggatccggtg atacctgcac atcaac 26  
 <210> 73  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer  
 <400> 73  
 aagcttaccg atagtaaaat cgtaggtt 28  
 <210> 74  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer  
 <400> 74  
 ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t 31  
 <210> 75  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer  
 <400> 75  
 gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc 28  
 <210> 76  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer  
 <400> 76  
 ggatccaaca acaacaaaca acctttgc 28  
 <210> 77  
 <211> 777  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <220>  
 <221> promoter  
 <222> (1)..(777)  
 <223> modified version of the AP3 promoter  
 <400> 77  
 gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt 60  
 tagttttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactggtcga 120  
 agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180  
 ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta 240

```

ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta 300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360
tatatatctc tttcttctta tttcccaa ataacagacaa aagtagaata ttggctttta 420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta 600
tcacttagtt ttcacaaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt 660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact 720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaatac tcttcaacaa aaagctt 777

```

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 212

&lt;212&gt; DNA

<213> *Solanum tuberosum*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; intron

&lt;222&gt; (1)..(212)

&lt;223&gt; PIV2 intron of ST-LS1 gene

&lt;400&gt; 78

```

gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60
gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120
gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata actttttctaa tatatgacca 180
aaatttggtg atgtgcaggt atcaccggat cc 212

```

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; DNA

<213> *Tagetes erecta*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(358)

<223> coding for sense-strand of epsilon cyclase  
promoter directed dsRNA

&lt;400&gt; 79

```

aagcttaccg atagtaaaat cgtaggttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60
gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtggttgaa tgagggttaa 120
tgaggtttta ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
cggccatata agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagttaa aacatacaac gtggctttta 240
aagatggctt ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaaggttg tttgttggtg ttgtcgac 358

```

&lt;210&gt; 80

&lt;211&gt; 361

&lt;212&gt; DNA

<213> *Tagetes erecta*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(361)

<223> coding for antisense-strand of epsilon cyclase  
promoter directed dsRNA

&lt;400&gt; 80

```

ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60
taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgagggt 120
aaatggagtt taattaaaaa aaagagaaga gaaagattaa gaggggtgat gggatattaa 180
agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggctt 240
taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca tatcctatcc attcaaattc 300
aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggatc 360
c 361

```

<210> 81  
<211> 1537  
<212> DNA  
<213> Cucumis sativus  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(1537)  
<223> promoter of chromoplast-specific  
carotenoid-associated protein (CHRC)

<400> 81  
gagctctaca aattagggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60  
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcaactttct tttcatatcc 120  
tattcactca agcctttacc atcttccttt tctattttcaa tactattttct acttcatttt 180  
tcacgttttt aacatctttc tttattttct gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc 240  
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt 300  
aatacaata aagtgaacaa aaatatctat aaataaacia atatataat tttgttagac 360  
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatattc tactttacct actaaatttg 420  
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaagc 480  
taaaccctat ttaaataagc aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt 540  
taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt 600  
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtc taacatagtc taaaattcaa acatccacat 660  
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tatttattta aataaaaaag actaataaat 720  
atataaaatg aatgttcata cgcagaccca ttttagagatg agtatgcttt cacatgctga 780  
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca 840  
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat 900  
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg 960  
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcaacaagg tcaatagtca 1020  
atattagggt ttattggact ttaaatagta tcaaacaaaat ctatgtgtga acttaaaaaat 1080  
tgtattaaat atttagggtt acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca 1140  
cgaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgcctcacat gcttcggttg gctcgtttta 1200  
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta 1260  
acaagccacg ttgcgtgcca ttgcaaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg 1320  
acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcgaaga tcaagggtat aatcgtcttt 1380  
ttgaattcta tttctcttta ttaaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt 1440  
taaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt 1500  
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt 1537

<210> 82  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 82  
gagctctaca aattagggtt ac 22

<210> 83  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 83  
aagcttatta tttccaaatt ccg 23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/03/08394

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 C12N15/11 C12N15/63 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EM PL [Online] 5 March 1999 (1999-03-05), NAKAMURA Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MHM17" XP002262011 Database accession no. AB024035 abstract	1,2,9-29
A	----- DATABASE EM PL [Online] 12 July 2000 (2000-07-12), GUILIANO G. ET AL.: "Arabidopsis thaliana lycopene epsilon cyclase gene, complete cds." XP002262012 Database accession no. AF117257 abstract ----- -/--	1,2,9-29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2003

Date of mailing of the international search report

15. 01 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 03/08394

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/32788 A (HANSENS LAB) 8 June 2000 (2000-06-08) SEQ ID NO:5 page 5, line 27 - page 6, line 24 -----	1,2,9-29
X	RONEN ET AL: "Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant" PLANT JOURNAL, vol. 17, no. 4, February 1999 (1999-02), pages 341-351, XP002123127 ISSN: 0960-7412 page 345, column 1, paragraph 4 - page 346, column 1, paragraph 1; figures 5,6; table 2 -----	1,2,9-29
A	CUNNINGHAM F X ET AL: "One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 98, no. 5, 27 February 2001 (2001-02-27), pages 2905-2910, XP002220813 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	1,2,9-29
P,A	SANDMANN GERHARD: "Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, vol. 116, no. 4, December 2002 (2002-12), pages 431-440, XP002262010 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) the whole document -----	1,2,9-29

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/08394**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: Claims 1, 2 and 9-17 (all incompletely)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1, 2 and 9-29 (all in part)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box I.2

Claims 1, 2 and 9-17 (all incompletely)

The current claims 1, 2 and 9-17 relate to a inordinately large number of possible nucleic acid molecules and methods in which these nucleic acid molecules are used. As a result of the inclusion of terms such as "functional equivalents" (as per page 7, line 34 to page 8, line 2; page 9, lines 15 to 30; page 12, line 19 to page 13, line 34; page 16, line 41 to page 17, line 5; and page 18, lines 14 to 26), "parts" (as per page 14, lines 10 to 12), "variations", "substantially identical" and "substantially complementary", these claims in fact encompass so many alternatives that they appear unclear and broadly worded (PCT Article 6) to the extent that it is impossible to conduct a meaningful search. The search was therefore directed to the parts of the claims that can be considered clear, namely the promoter sequences that are actually disclosed (SEQ ID Nos. 1, 7 and 8) and methods in which these nucleic acid molecules are used.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

Box II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1, 2 and 9-29 (all in part)

Method for the transgenic expression of nucleic acid sequences using a promoter sequence according to SEQ ID No. 1; transgenic expression cassettes comprising *inter alia* said promoter sequence; isolated nucleic acid sequence comprising *inter alia* said promoter sequence; double-strand RNA molecule comprising a sense strand and an antisense strand, at least part of which encodes a promoter region of said sequence; ribonucleic acid molecule, of which *inter alia* one part encodes a promoter region of said sequence; transgenic expression vector containing said expression cassette; transgenic organisms containing said sequence or said RNA molecule; uses of said sequence or said RNA molecule or said transgenic organisms; method for producing various products using said transgenic organisms and method for producing ketocarotenoids using said sequence.

## 2. Claims 1, 2 and 9-29 (all in part)

Method for the transgenic expression of nucleic acid sequences using a promoter sequence according to SEQ ID No. 7; transgenic expression cassettes comprising *inter alia* said promoter sequence; isolated nucleic acid sequence comprising *inter alia* said promoter sequence; double-strand RNA molecule comprising a sense strand and an antisense strand, at least part of which encodes a promoter region of said sequence; ribonucleic acid molecule, of which *inter alia* one part encodes a promoter region of said sequence; transgenic expression vector containing said expression cassette; transgenic organisms containing said sequence or said RNA molecule; uses of said sequence or said RNA molecule or said transgenic organisms; method for producing various products using said transgenic organisms and method for producing ketocarotenoids using said sequence.

## 3. Claims 1, 2 and 9-29 (all in part)

Method for the transgenic expression of nucleic acid sequences using a promoter sequence according to SEQ ID No. 8; transgenic expression cassettes comprising *inter alia* said promoter sequence; isolated nucleic acid sequence comprising *inter alia* said promoter sequence; double-strand RNA molecule comprising a sense strand and an antisense strand, at least part of which encodes a promoter region of said sequence; ribonucleic acid molecule, of which *inter alia* one part encodes a promoter region of said sequence; transgenic expression vector containing said expression cassette; transgenic organisms containing said sequence or said RNA molecule; uses of said sequence or said RNA molecule or said transgenic organisms; method for producing various products using said transgenic organisms and method for producing ketocarotenoids using said sequence.

## 4. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least SEQ ID No. 17; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least the aforementioned sequence.

## 5. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least SEQ ID No. 18; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least the aforementioned sequence.



## 6. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least SEQ ID No. 19; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least the aforementioned sequence.

## 7. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least SEQ ID No. 20; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least the aforementioned sequence.

## 8. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least SEQ ID No. 21; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least the aforementioned sequence.

## 9. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least SEQ ID No. 22; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence that codes for an amino acid sequence comprising at least the aforementioned sequence.

## 10. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 23; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

## 11. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to

SEQ ID No. 25; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

12. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 27; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

13. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 29; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

14. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 31; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

15. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 33; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

16. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 35; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

17. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 37; method for producing a transgenic expression cassette which is

specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

18. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 39; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

19. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 41; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

20. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 43; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

21. Claims 3-8 (all in part)

Method for identifying and/or isolating promoters of genes that code for an epsilon cyclase using a nucleic acid sequence comprising a sequence according to SEQ ID No. 45; method for producing a transgenic expression cassette which is specific to the plant blossom using a nucleic acid sequence comprising the aforementioned sequence.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/08394

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0032788 A	08-06-2000	US 6232530 B1	15-05-2001
		AU 1503000 A	19-06-2000
		WO 0032788 A2	08-06-2000
		EP 1137782 A2	04-10-2001
		JP 2002531094 T	24-09-2002
		PL 348454 A1	20-05-2002
-----			

## INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

International Aktzeichen

PCT 03/08394

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/82 C12N15/11 C12N15/63 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE EM PL [Online] 5. März 1999 (1999-03-05), NAKAMURA Y.: "Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, P1 clone:MHM17" XP002262011 Database accession no. AB024035 Zusammenfassung	1,2,9-29
A	DATABASE EM PL [Online] 12. Juli 2000 (2000-07-12), GUILIANO G. ET AL.: "Arabidopsis thaliana lycopene epsilon cyclase gene, complete cds." XP002262012 Database accession no. AF117257 Zusammenfassung	1,2,9-29

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. 01. 2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/32788 A (HANSENS LAB) 8. Juni 2000 (2000-06-08) SEQ ID NO:5 Seite 5, Zeile 27 - Seite 6, Zeile 24 -----	1,2,9-29
X	RONEN ET AL: "Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant" PLANT JOURNAL, Bd. 17, Nr. 4, Februar 1999 (1999-02), Seiten 341-351, XP002123127 ISSN: 0960-7412 Seite 345, Spalte 1, Absatz 4 - Seite 346, Spalte 1, Absatz 1; Abbildungen 5,6; Tabelle 2 -----	1,2,9-29
A	CUNNINGHAM F X ET AL: "One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd. 98, Nr. 5, 27. Februar 2001 (2001-02-27), Seiten 2905-2910, XP002220813 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument -----	1,2,9-29
P,A	SANDMANN GERHARD: "Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, Bd. 116, Nr. 4, Dezember 2002 (2002-12), Seiten 431-440, XP002262010 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) das ganze Dokument -----	1,2,9-29

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1,2,9-17 (alle unvollständig)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1,2,9-29 (alle teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

-----

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1,2,9-17 (alle unvollständig)

Die geltenden Patentansprüche 1,2,9-17 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Nukleinsäuremoleküle und Verfahren, in denen diese Nukleinsäuremoleküle eingesetzt werden. In der Tat umfassen sie durch das Einschliessen von Begriffen wie "funktionellen Äquivalenten" gemäss S. 7, Z.34-S.8, Z.2, S. 9, Z.15-30S. 12, Z. 19-S.13, Z.34, S.16, Z.41-S17, Z. 5, S.18, Z.14-26 oder "Teilen" gemäss S. 14, Z.10-12 oder "Variationen" oder "im wesentlichen identisch" oder "im wesentlichen komplementär" so viele Wahlmöglichkeiten, daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar und zu weitläufig gefasst erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar gelten können, nämlich die tatsächlich offenbarten Promotorsequenzen gemäss SEQ ID NO:1,7 und 8 sowie Verfahren, in denen diese Nukleinsäuremoleküle eingesetzt werden.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.



## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1,2,9-29 (alle teilweise)

Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung einer Promotorsequenz gemäß SEQ ID NO:1; transgene Expressionskassetten umfassend u.a. besagte Promotorsequenz; isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend u.a. besagte Promotorsequenz; doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend einen "sense" und "antisense" Strang, wobei mindestens ein Teil davon einen Promotorbereich besagter Sequenz kodiert; Ribonukleinsäuremolekül, von dem u.a. ein Teil einen Promotorbereich besagter Sequenz kodiert; transgener Expressionsvektor enthaltend besagte Expressionskassette; transgener Organismus, enthaltend besagte Sequenz oder besagte RNA-Moleküle; Verwendungen der besagten Sequenz oder besagter RNA-Moleküle oder besagter transgener Organismen; Verfahren zur Herstellung von diversen Produkten unter Verwendung besagter transgener Organismen und Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden unter Verwendung besagter Sequenz.

---

2. Ansprüche: 1,2,9-29 (alle teilweise)

Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung einer Promotorsequenz gemäß SEQ ID NO:7; transgene Expressionskassetten umfassend u.a. besagte Promotorsequenz; isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend u.a. besagte Promotorsequenz; doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend einen "sense" und "antisense" Strang, wobei mindestens ein Teil davon einen Promotorbereich besagter Sequenz kodiert; Ribonukleinsäuremolekül, von dem u.a. ein Teil einen Promotorbereich besagter Sequenz kodiert; transgener Expressionsvektor enthaltend besagte Expressionskassette; transgener Organismus, enthaltend besagte Sequenz oder besagte RNA-Moleküle; Verwendungen der besagten Sequenz oder besagter RNA-Moleküle oder besagter transgener Organismen; Verfahren zur Herstellung von diversen Produkten unter Verwendung besagter transgener Organismen und Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden unter Verwendung besagter Sequenz.

---

3. Ansprüche: 1,2,9-29 (alle teilweise)

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung einer Promotorsequenz gemäss SEQ ID NO:8; transgene Expressionskassetten umfassend u.a. besagte Promotorsequenz; isolierte Nukleinsäuresequenz umfassend u.a. besagte Promotorsequenz; doppelsträngiges RNA-Molekül umfassend einen "sense" und "antisense" Strang, wobei mindestens ein Teil davon einen Promotorbereich besagter Sequenz kodiert; Ribonukleinsäuremolekül, von dem u.a. ein Teil einen Promotorbereich besagter Sequenz kodiert; transgener Expressionsvektor enthaltend besagte Expressionskassette; transgener Organismus, enthaltend besagte Sequenz oder besagte RNA-Moleküle; Verwendungen der besagten Sequenz oder besagter RNA-Moleküle oder besagter transgener Organismen; Verfahren zur Herstellung von diversen Produkten unter Verwendung besagter transgener Organismen und Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden unter Verwendung besagter Sequenz.

---

## 4. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die SEQ ID NO:17 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die o.g. Sequenz umfasst.

---

## 5. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die SEQ ID NO:18 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die o.g. Sequenz umfasst.

---

## 6. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)

**WEITERE ANGABEN****PCT/ISA/ 210**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die SEQ ID NO:19 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die o.g. Sequenz umfasst.

---

**7. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die SEQ ID NO:20 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die o.g. Sequenz umfasst.

---

**8. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die SEQ ID NO:21 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die o.g. Sequenz umfasst.

---

**9. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die SEQ ID NO:22 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Aminosäuresequenz kodiert, welche mindestens die o.g. Sequenz umfasst.

---

**10. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

**WEITERE ANGABEN****PCT/ISA/ 210**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:23 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**11. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:25 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**12. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:27 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**13. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:29 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**14. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:31 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**15. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

**WEITERE ANGABEN****PCT/ISA/ 210**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:33 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**16. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:35 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**17. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:37 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**18. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:39 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**19. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:41 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.

---

**20. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

**WEITERE ANGABEN****PCT/ISA/ 210**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:43 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.  
---

**21. Ansprüche: 3-8 (alle teilweise)**

Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für eine epsilon-Cyclase kodieren unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Sequenz gemäss SEQ ID NO:45 umfasst; Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für die pflanzliche Blüte unter Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, die die o.g. Sequenz umfasst.  
---

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PC/EP 03/08394

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0032788 A	08-06-2000	US 6232530 B1	15-05-2001
		AU 1503000 A	19-06-2000
		WO 0032788 A2	08-06-2000
		EP 1137782 A2	04-10-2001
		JP 2002531094 T	24-09-2002
		PL 348454 A1	20-05-2002
-----			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**